

Differenzierung von Stammzellen aus Fettgewebe in epitheliale Tubuluszellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Nadine Griesche
aus Berlin

Frankfurt am Main 2010
(D30)

Vom Fachbereich 15 der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. Jürgen Bereiter-Hahn
Prof. Dr. Helmut Geiger

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis.....	XII
1. Einleitung	1
1.1. Stammzellen	1
1.2. Heterogenität mesenchymaler Stammzellen	4
1.3. Die Stammzellnische	5
1.4. Extrazelluläre Matrix.....	7
1.5. Epithelzellen.....	9
1.7. Regeneration von Nierenschädigungen.....	10
1.8. Regenerative Medizin	12
1.10. Fragestellung /Ziel.....	14
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1. Technische Geräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Chemikalien	19
2.1.4. Medien und Mediensupplemente	22
2.1.5. Material für Molekularbiologie.....	23
2.1.6. Antikörper	23
2.1.6.1. Primärantikörper.....	23
2.1.6.2. Sekundärantikörper	24
2.1.7. Primer	24
2.2. Methoden.....	26
2.2.1. Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen.....	26
2.2.2. Zellkultur	26
2.2.2.1. Isolierung von Stammzellen aus Fettgewebe	26
2.2.2.2. Immunomagnetische Separation	28
2.2.2.3. Zellisolierung aus der Niere	29
2.2.2.4. Umsetzen der Zellen.....	29
2.2.2.5. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	30
2.2.2.6. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	31

2.2.2.7. Adipogene Differenzierung.....	31
2.2.2.8. Osteogene Differenzierung	32
2.2.2.9. Oil-Red-O-Färbung	32
2.2.2.10. Van Kossa-Färbung.....	33
2.2.3. Zellbiologie	33
2.2.3.1. Nachweis der Proliferation.....	33
2.2.4. Induktionsansätze zur Differenzierung der Stammzellen in Epithelzellen	34
2.2.4.1. Zellkultivierung mit Wachstumsfaktoren.....	34
2.2.4.2. Kultur auf einer extrazellulären Matrix.....	35
2.2.4.2.1. Gewinnung einer extrazellulären Matrix aus Tubuluszellen.....	35
2.2.4.2.2. Versuche mit Matrigel.....	37
2.2.4.3 Co-Kultur von ASC und TEC	39
2.2.4.3.1. Indirekte Co-Kultur mit Membraneinsätzen	39
2.2.4.3.2 Direkte Co-Kultur	40
2.2.5. Immunologische Methoden.....	41
2.2.5.1. Immunfluoreszenztest	41
2.2.5.2. Western Blot.....	42
2.2.5.3. Lowry-Test zur Proteinbestimmung.....	45
2.2.5.4. Durchflusszytometrie	45
2.2.5.5. HGF-ELISA	47
2.2.5.6. Fluoreszenz in situ Hybridisierung	49
2.2.5.6.1. Induktion der Metaphase.....	49
2.2.5.6.2. Cytocell Kit	50
2.2.6. Polymerase-Ketten Reaktion.....	50
2.2.6.1. RNA-Extraktion	50
2.2.6.2. cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	51
2.2.6.3. PCR	52
2.2.6.4. qPCR	53
2.2.7. Histologische Methoden.....	54
2.2.7.1. Paraffineinbettung für Schnitte	54
2.2.7.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	54
2.2.8. Raster-Elektronenmikroskopie.....	55
2.2.9. Statistische Auswertung	55
3. Ergebnisse	56

3.1. Einfluss von chemischen Faktoren und Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung .	56
3.1.1. Ergebnisse der Zellkultur mit Wachstumsfaktoren	56
3.1.2. HGF-ELISA	67
3.2. Einfluss von extrazellulären Matrices auf die Differenzierung von Stammzellen aus Fettgewebe	70
3.2.1. Extrazelluläre Matrix aus Tubuluszellen.....	70
3.2.2. Matrigel	74
3.3. Einfluss der Co-Kultur von Tubuluszellen und Stammzellen aus Fettgewebe	81
3.3.1. Indirekte Co-Kultur	81
3.3.2 Direkte Co-Kultur	85
3.3.2.1. Fluoreszenz in-situ Hybridisierung.....	85
3.3.2.2 Evaluierung der einzusetzenden Menge an CellTracker green CMFDA.....	85
3.3.2.2 Direkte Co-Kultur mit CellTracker	87
3.3.2.3 Fixierung der mit CellTracker markierten Zellen	90
3.4. Untersuchungen zur Reduzierung der Heterogenität von Stammzellen aus Fettgewebe	92
4. Diskussion	102
4.1. Einfluss löslicher Faktoren auf die Differenzierung von Stammzellen aus Fettgewebe in epitheliale Tubuluszellen	102
4.1.1. Medienzusammensetzung und HGF Sezernierung	105
4.1.2. ATRA, Activin A und BMP-7	106
4.1.3. EGF, KGF, HGF und IGF-2.....	108
4.2. Einfluss von extrazellulären Matrices auf die Differenzierung von Stammzellen aus Fettgewebe	109
4.3. Einfluss der Co-Kultur von Tubuluszellen und Stammzellen.....	112
4.4. Untersuchungen zur Reduzierung der Heterogenität von Stammzellen aus Fettgewebe	114
5. Zusammenfassung/Ausblick	119
6. Summary	121
7. Referenzen.....	122
Anhang 1: Nukleofektion mit hTERT.....	136
Anhang 2 - Tabellen.....	140

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ActA	Aktivin A
aFGF	Saurer Fibroblasten Wachstumsfaktor
AJ	Adhärenzkontakte (adherence junctions)
AK	Antikörper
AKI	Acute Kidney Injury
APC	Adenomatous polyposis coli Protein
Apq1	Aquaporin 1
ASC	Stammzellen aus Fettgewebe (Adipose-derived stromal cells)
ATRA	All-trans Retinolsäure
Å	Ångström
bFGF	Basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
BG	Blutgefäß
β-ME	β-Mercaptoethanol
BMI	Body Mass Index
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein
BM-MSC	Stammzellen aus Knochenmark
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
βTrCP	β-transducin repeat-containing homologes Protein
CD13	Aminopeptidase M
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CFU	Kolonie bildende Einheit
CK1	Casein Kinase 1
CK18	Zytokeratin 18
CKD	Chronische Nierenerkrankung
cm	Zentimeter
Col IV	Collagen IV
cRet	eine Rezeptor Tryrosin Kinase
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DF	DMEM Medium mit FKS

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Nukleinsäuretriphosphate
3D	dreidimensional
Dsh	Dishevelled Protein
DZ	Differenzierte Zelle
dTEC	Distale Tubuluszellen
E-Cad	E-Cadherin
ECL	Enhanced Chemiluminescence Lösung
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EHS	Engelberth-Holm-Swarm
ELISA	Immunoassay (enzyme- linked immunosorbent assay)
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
ES	Embryonale Stammzellen
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorter)
FKS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FSC	forward scatter (Durchflusszytometrie)
g	Beschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
GDNF	Von Glia-Zelllinien stammender Faktor
GKS3 β	Glykogensynthase Kinase 3 β
GMP	Good Manufacturing Practice
GVHD	Graft-versus-Host-Reaktion
Gy	Gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
h	Stunde
dH ₂ O	destilliertes Wasser
hBM-MSC	Mesenchymale Stammzellen aus humanem Knochenmark
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HLA	Humanes Leukozytenantigen

HMDS	Hexamethyldisilazan
HRP	Meerrettich Peroxidase (Horseradish-peroxidase)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IFN	Interferon
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IL1 β	Interleukin 1 beta
ILF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
JNK	cJun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinozyten Wachstumsfaktor
kM	Konditioniertes Medium
l	Liter
LEF	Lymphoid enhancer Faktor
LIF	Leukemia inhibitory factor
m	Meter
M	Molar
mA	Milliamper
mAb	Monoklonaler Antikörper
MACS	Immunomagnetische Zellaufreinigung (magnetic antibody cell sorting)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MET	Mesenchymale-epitheliale Umwandlung
MHC	Haupt-Gewebeverträglichkeits Antigene
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MSC	Mesenchymale Stammzellen
M199	Medium 199
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NEM	N-Ethylmaleimide

NGF	Nervenwachstumsfaktor
NK	Natürliche Killer
nm	Nanometer
occ	Occludin
oct4	POU class 5 homeobox 1
OD	Optische Dichte
pAK	Primärantikörper
panCK	Pan Zytokeratin
Pax2	Paired Box Protein 2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCP	Planare Zellpolarität
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDGF	von Plättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptavidin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pTEC	Proximale Tubuluszellen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sall1	sal-like 1
sec	Sekunde
six2	SIX homeobox 2
smA	Glattmuskuläres Aktin (Smooth-Muscle-Actin)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfat)
SSC	sidward scatter (in der Durchflusszytometrie)
SSC- Puffer	Saline Natrium Citrat Puffer (saline sodium citrate)
SSEA-4	Stage-specific embryonic antigen 4
Tab.	Tabelle
TCF	T-Zellfaktor
TEC	Tubuluszellen
TGF- α	Transformierender Wachstumsfaktor α
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β

TIN-Ag	Tubulointerstitial Antigen
TJ	Verschlusskontakte (tight junctions)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	tumor necrosis factor
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
wnt	wingless-type MMTV integration site family
WT-Mix	Mischung aus den Wachstumsfaktoren HGF, EGF, KGF und IGF-2
ZO-1	Zona occludens Protein 1
ZO-2	Zona occludens Protein 2

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Die mesenchymale Stammzellnische	5
Abb. 2	Alternative Modelle für die Stammzellentwicklung	6
Abb. 3	Schematisches Model der fokalen Adhäsion	7
Abb. 4	Verbindungen zwischen Zellen	9
Abb. 5	Schematische Darstellung einer epithelialen Zelle mit den typischen Zellverbindungen	10
Abb. 6	Mögliche Mechanismen zur Reparatur des Nierenepithels nach Verletzungen ...	11
Abb. 7	Übersicht über den Ablauf der Isolation von Stammzellen aus Liposuktionsaspirat	27
Abb. 8	Schema der immunomagnetischen Isolation	29
Abb. 9	Färbung der extrazellulären Matrix von Tubuluszellen mit Coomassie Blau	36
Abb. 10	Darstellung von BD Falcon Zellkultur Membraneinsätzen	39
Abb. 11	Darstellung von BD Falcon Zellkultur Membraneinsätzen 2	39
Abb. 12	CellTracker CMFDA green: Strukturformel	40
Abb. 13	Beispiel für die Anfärbung der Banden mit Coomassie Blau	44
Abb. 14	Proliferationstest mit Wachstumsfaktoren	57
Abb. 15	Proliferationstest mit bFGF	58
Abb. 16	Proliferationstest mit bFGF/VEGF	58
Abb. 17	Proliferationstest: ATRA, ActA und BMP-7	59
Abb. 18	Western Blot für den Zusatz von ATRA, ActA und BMP-7 zum Medium	60
Abb. 19	Proteinexpression von CK18 und ZO-1 nach der 14-tägigen Kultur mit ATRA, ActA und BMP-7	60
Abb. 20	Proteinexpression von CK18 und ZO-1 nach der 14tägigen Kultur mit ATRA, ActA und BMP-7 bei konfluenten Zellen	61
Abb. 21	qPCR von ASC nach der Behandlung mit ATRA, ActA und BMP-7	62
Abb. 22	qPCR von konfluenten ASC nach der Behandlung mit ATRA, ActA und BMP-7	63
Abb. 23	Immunfluoreszenzaufnahmen von panCK und ZO-1 bei der Anwendung verschiedener Medienzusätz	65
Abb. 24	Fluoreszenzfärbung mit CK18 bei der Induktion der epithelialen Differenzierung mit ATRA, ActA und BMP-7.....	66
Abb. 25	Vergleich verschiedener Medienzusätze für die HGF Produktion von ASC	67

Abb. 26	Vergleich von verschiedenen Wachstumsfaktoren und einem Zytokin- Mix zur Induktion der HGF Produktion von ASC	69
Abb. 27	Vergleich der extrazellulären Matrix nach dem Ablösen der Tubuluszellen mit unterschiedlichen Lösungen	71
Abb. 28	Mikroskopische Aufnahme der Extrazellulären Matrix von der Negativfraktion	72
Abb. 29	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von unbeschichteten Plastik Oberflächen im Vergleich zu der extrazellulären Matrix aus proximalen Tubuluszellen	72
Abb. 30	CK18 und ZO-1 Expression nach 14 Tagen Kultur mit verschiedenen Wachstumsfaktoren auf einer extrazellulären Matrix von Tubuluszellen (densitometrische Analyse von Western Blots)	73
Abb. 31	qPCR Ergebnisse: CK18, wnt-4, smA und Aquaporin 1 Expression nach 14 Tagen Kultur mit verschiedenen Wachstumsfaktoren auf einer extrazellulären Matrix von Tubuluszellen	73
Abb. 32	3D Kultur auf Matrigel	74
Abb. 33	Vergleich der Morphologie von ASC nach 14-tägiger Kultur auf Matrigel aus zwei Versuchen	75
Abb. 34	DAPI Färbung von ASC auf Matrigel	76
Abb. 35	ASC in Matrigel, Fluoreszenzfärbung	76
Abb. 36	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von ASC in Matrigel	77
Abb. 37	Kultur von ASC auf einer dicken Schicht Matrigel, Collagen IV oder Zellkulturplastik zur Kontrolle (Western Blot, densitometrische Auswertung) ..	77
Abb. 38	Matrigel als Medienzusatz (Western Blot, densitometrische Analyse)	78
Abb. 39	Expression von CK18 und ZO-1 nach der Induktion mit Matrigel als Medienzusatz (Western Blot).....	78
Abb. 40	Matrigel als dünne Beschichtung mit verschiedenen Konzentrationen und drei Medien	79
Abb. 41	PCR Ergebnisse von ASC nach 14-tägiger Kultivierung mit Matrigel und verschiedenen Medien	80
Abb. 42	Morphologie von ASC nach 14d indirekter Co-Kultur über Membraneinsätze mit Nierengewebe oder Tubuluszellen	82
Abb. 43	Western Blot: exemplarische Abbildung für die Co-Kultur mit Membraneinsatz	82
Abb. 44	CK18 und ZO-1 Expression in ASC bei der indirekten Co-Kultur mit Nierengewebe	83

Abb. 45	Indirekte Co-Kultur von ASC und TEC	84
Abb. 46	Indirekte Co-Kultur mit H ₂ O ₂ behandelten Tubuluszellen	84
Abb. 47	Aufnahme einer Zelle nach der in-situ Hybridisierung	85
Abb. 48	Beispiel für die Intensität des CellTrackers green CMFDA nach 2d und 7d abhängig von der eingesetzten Konzentration des CellTrackers	86
Abb. 49	Proliferation der mit CellTracker green CMFDA markierte Tubuluszellen nach 1, 3 und 6 Tagen	87
Abb. 50	Fluoreszenzaufnahmen von markierten Tubuluszellen	87
Abb. 51	FACS Analyse von Co-Kulturen mit grün markierten Tubuluszellen (CMFDA CellTracker) und ASC	88
Abb. 52	Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach 4 Tagen Co-Kultur	89
Abb. 53	Direkte Co-Kultur nach 4d Kultur	89
Abb. 54	Direkte Co-Kultur nach 7d Kultur	90
Abb. 55	Verlauf der CellTracker Intensität über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen in Tubuluszellen nach der Fixierung mit PFA.....	91
Abb. 56	Charakteristische Muster von Oberflächenmarker von ASC	93
Abb. 57	Immunfluoreszenzfärbung von smA (rot) und Desmin (grün)	94
Abb. 58	Expression von Oberflächenmarkern auf ASC	95
Abb. 59	Zusätzliche Analyse zur Charakterisierung von ASC	96
Abb. 60	qPCR Analyse von isolierten ASC mit der Standardmethode und nach 1h gewaschenen Zellen	96
Abb. 61	Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern immunomagnetisch isolierter ASC	97
Abb. 62	qPCR Analyse von isolierten ASC mit der Standardmethode und immunomagnetischer Isolation	98
Abb. 63	Differenzierungspotential von ASC (immunomagnetische Aufreinigung)	99
Abb. 64	Prozent positiver Zellen nach adipogener Induktion immunomagnetisch isolierter Zellen	99
Abb. 65	Oil-Red-O-Färbung gewaschener und Standard isolierter Zellen	100
Abb. 66	Prozent positiver Zellen nach der adipogenen Induktion	101
Abb. 67	Lentiviraler Vektor pLXSN: Restriktionsmappe und Multiple Cloning Site	137
Abb. 68	Vektorkontrolle hTERT	139

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Antikörper für die Immunomagnetische Isolation	28
Tab. 2	Konzentration verwendeter Wachstumsfaktoren für Versuche mit ATRA, ActA und BMP-7	35
Tab. 3	Konzentration verwendeter Wachstumsfaktoren	35
Tab. 4	Zusammensetzung von Matrigel	37
Tab. 5	Zusammensetzung des Trenngels bei verschiedenen Konzentrationen des Polyacrylamids	43
Tab. 6	Zusammensetzung des Sammelgels	43
Tab. 7	Primär- und Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie	46
Tab. 8	Konzentration der Wachstumsfaktoren und Zytokine für den HGF-ELISA	48
Tab. 9	Vergleich der HGF Sezernierung nach zwei und vier Tagen Kultur mit unterschiedlichen Medien	68
Tab. 10	Vergleich der HGF Sezernierung nach zwei und vier Tagen Kultur mit weiteren Medien	69
Tab. 11	CellTracker markierte Tubuluszellen nach 6, 9 und 14 Tagen Kultur	91
Tab. 12	Oil-Red-O- Färbung gewaschener und Standard isolierter Zellen	101
Tab. 13	Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren	140
Tab. 14	Proliferationsassay bFGF	140
Tab. 15	Proliferationsassay bFGF und VEGF	140
Tab. 16	Proliferationsassay ATRA, ActA und BMP-7	141
Tab. 17	qPCR Ergebnisse mit den Medienzusätzen ATRA, ActA und BMP-7	141
Tab. 18	qPCR Ergebnisse mit den Medienzusätzen ATRA, ActA und BMP-7 bei konfluenten Zellen	141
Tab. 19	Western Blot Ergebnisse mit den Medienzusätzen ATRA, ActA und BMP-7	142
Tab. 20	Western Blot Ergebnisse mit den Medienzusätzen ATRA, ActA und BMP-7 bei konfluenten Zellen	142
Tab. 21	Extrazelluläre Matrix aus Tubuluszellen (Western Blot)	143
Tab. 22	pPCR extrazelluläre Matrix aus Tubuluszellen	143
Tab. 23	CK18 und ZO-1 Expression bei Matrigel als dicke Beschichtung (Western Blot, densitometrische Analyse)	143
Tab. 24	CK18 und ZO- 1 Expression bei Matrigel als Medienzusatz (Western Blot, densitometrische Analyse).....	144

Tab. 25	CK18 Expression bei Matrigel als dünne Beschichtung (Western Blot, densitometrische Analyse)	144
Tab. 26	ZO-1 Expression bei Matrigel als dünne Beschichtung (Western Blot, densitometrische Analyse)	145
Tab. 27	Indirekte Co-Kultur mit Membraneinsätzen mit Nierengewebe: CK 18 (Western Blot, densitometrische Analyse)	145
Tab. 28	Indirekte Co-Kultur mit Membraneinsätzen mit Nierengewebe: ZO-1 (Western Blot, densitometrische Analyse)	145
Tab. 29	Indirekte Co-Kultur mit Membraneinsätzen mit Tubuluszellen (Western Blot, densitometrische Analyse)	146
Tab. 30	Western Blot Ergebnisse für die indirekte Co-Kultur mit H ₂ O ₂ verletzten Tubuluszellen: CK18 (densitometrische Analyse)	146
Tab. 31	Direkte Co-Kultur von ASC und TEC: 4d	146
Tab. 32	Direkte Co-Kultur von ASC und TEC: 4d im Vergleich zur Standardkultur	147
Tab. 33	Direkte Co-Kultur von ASC und TEC: 7d	147
Tab. 34	Markerexpression gewaschene ASC	147
Tab. 35	Markerexpression Standard isolierte ASC	148
Tab. 36	qPCR gewaschener ACS (Nestin, oct4, sall1, six2, smA, Desmin)	148
Tab. 37	Expression von Oberflächenmarkern bei immunomagnetisch isolierten Zellen .	149
Tab. 38	qPCR immunomagnetisch isolierter Zellen (Nestin, oct4, sall1, six2, smA, Desmin)	149
Tab. 39	Oil-Red-O-Färbung nach adipogener Induzierung der immnuomagnetisch aufgereinigten ASC	149

1. Einleitung

1.1. Stammzellen

Stammzellen sind laut ihrer Definition durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in multiple Pfade gekennzeichnet. Es gibt embryonale oder adulte Stammzellen, die sich in ihrer Fähigkeit zur Differenzierung unterscheiden. Embryonale Stammzellen (ES), die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste stammen, sind pluripotent und können in alle Zelltypen der drei Keimblätter und in Keimbahnzellen ausdifferenzieren, während adulte Stammzellen ausschließlich in Zelltypen der 3 Keimblätter differenzieren können. Als weitere Vorläuferzellen sind Progenitorzellen zu erwähnen, die aber im Gegensatz zu adulten Stammzellen in ihrer Differenzierungsfähigkeit bereits spezifisch auf bestimmte Zellarten festgelegt sind. Für die Verwendung in der Stammzelltherapie spielen zusätzlich zum Differenzierungs-potential andere Faktoren wie Praktikabilität, Abstoßung oder Tumorbildung eine Rolle. Bei adulten Stammzellen werden häufig autologe Behandlungen durchgeführt, wodurch kein Risiko zur Abstoßung besteht. Bei der nicht autologen Anwendung von Stammzellen, kann es zu Abstoßungsreaktionen kommen. Da ES nicht autolog eingesetzt werden können, ist bei der Therapie auch das Risiko einer Abstoßung größer [Wu et al., 2008]. Bei der Tumorbildung nach einer Transplantation sieht es ähnlich aus. Undifferenzierte ES können Tumore, so genannte Teratoma, verursachen, während unkontrolliertes Wachstum bei adulten Stammzellen unwahrscheinlich ist. Hinzu kommen noch - gerade hier in Deutschland - die bekannten ethischen Bedenken bei dem Einsatz von ES. In Deutschland ist es nach dem Stammzellgesetz (Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen) nur bedingt erlaubt, ES für die Forschung einzuführen. Die ethischen Ziele, die diesem Gesetz zugrunde liegen, sind: keine Herstellung von menschlichen Embryonen zu Forschungszwecken, kein Anreiz zum Verbrauch von Embryonen für die Forschung und den Import von ES nur im Ausnahmefall und für einen streng definierten Korridor der Forschung zuzulassen. Daher sind in den letzten Jahren bei der Zelltherapie und im Tissue Engineering mesenchymale Stammzellen (MSC) immer stärker in den Vordergrund getreten. Sie sind mesodermalen Ursprungs und können laut Definition zumindest in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren [Dominici et al., 2006]. Außerdem konnte eine Differenzierung in verschiedene Myozyten gezeigt werden: in Skelettmuskel [Lee et al., 2006; Mizuno et al., 2002; Zuk et al., 2001], glattmuskuläre Zellen

[Jack et al., 2005; Rodriguez et al., 2006] und Kardiomyozyten [Fraser et al., 2006]. Zusätzlich wurde bewiesen, dass MSC auch in Zelltypen nicht-mesodermalen Ursprungs wie Hepatozyten [Banas et al., 2007; Lange et al., 2006], neuronen-artige Zellen bzw. neuronale Vorläuferzellen [Asjian et al., 2003; Krampera et al., 2006; Safford et al., 2002 und 2004], Pankreaszellen [Timper et al., 2006], Hämatopoese unterstützende Zellen [Corre et al., 2006; Kilroy et al., 2007] und endotheliale Zellen [Cao et al., 2005; Planat-Benard et al., 2004] differenzieren können. Ursprünglich wurden MSC aus Knochenmark gewonnen, inzwischen sind aber noch viele andere Quellen entdeckt worden. Als häufigste Alternative werden MSC aus adipösem Gewebe oder Nabel-schnurblut gewonnen, aber es sind auch schon MSC aus Dentalgewebe [Huang et al., 2009], der Plazenta [Huang et al., 2009] und aus diversen weiteren Quellen [Haut: Salvolini et al., 2009; amniotische Membran: Insausti et al., 2010; Kolf et al., 2007; Lunge: Sabatini et al., 2005; Synovialmembran: De Bari et al., 2001; in der Maus: Gehirn, Milz, Leber, Niere, Nieren Glomeruli, Lunge Knochenmark, Muskeln, Thymus, Pankreas: Da Silva Meirelles et al., 2006] isoliert worden. Die MSC aus unterschiedlichen Gewebearten zeigen einen sehr ähnlichen Immunphänotyp [Banas et al., 2007; Dicker et al., 2005; Gronthos, 2001; Kern et al., 2006; Wagner et al., 2005], wodurch die Auswahl einer geeigneten Quelle für MSC gewachsen ist. Laut Zuk et. al. [2002] ist der Immunphänotyp im direkten Vergleich von MSC aus humanem Knochenmark (hBM-MS) und aus humanem Fettgewebe (hASC) mehr als 90% identisch. Geringe Unterschiede können auch bei MSC aus dem gleichen Gewebetyp auftreten, da Fett z. B. makroskopisch in fünf unterschiedliche Arten eingeteilt werden kann. Es gibt Knochenmark, das als Energiereservoir und Zytokinquelle für osteogene und hämatopoetische Abläufe dient, braunes Fettgewebe, welches um die Hauptorgane von Neugeborenen gelagert ist und thermogene Eigenschaften hat, und Brustfettgewebe, welches Nährstoffe und Energie während der Stillzeit liefert und über schwangerschafts-assoziierte Hormone reguliert wird. Außerdem kommen mechanisches Fettgewebe, welches Schutz für Augen, Hand und andere kritische Strukturen bietet, sowie weißes Fettgewebe, das als Energiereserve dient und zur Isolation von Stammzellen aus Fettgewebe (ASC) verwendet wird [Gimble et al., 2007], vor. Fettgewebe besteht im wesentlichen aus reifen Adipozyten, Bindegewebe, ASC, eingewanderten Blutzellen, glattemuskulären Zellen und Perizyten, sowie vaskulären Zellen, wie z. B. endothelialen Vorläuferzellen [Yoshimura et al., 2006]. Adipozyten nehmen dabei ungefähr zwei Drittel der Zellzahl bzw. mehr als 90% des Volumens ein [van Harmelen et al., 2005]. Die stroma-vaskuläre Fraktion, aus der ASC isoliert werden, wird als heterogene Population beschrieben, die Mastozyten (Mastzellen), endotheliale Zellen, Perizyten, Fibroblasten, vorbestimmte

Vorläuferzellen und Preadipozyten enthält. Die Ausbeute an ASC variiert zwischen den Donoren und ist abhängig von mehreren Faktoren, wie beispielsweise der Liposuktionsstelle, der Lagerzeit und der Isolationsmethode [Aust et al., 2004; Bakker et al., 2004, van Hamelen et al., 2004]. Jurgens et al. (2007) haben untersucht, ob sich die verschiedenen Regionen, aus denen das Fettgewebe stammen kann, voneinander unterscheiden. Sie haben Fettgewebe aus dem Bauch und aus der Hüft/Bein- Region miteinander verglichen und dabei festgestellt, dass ASC sich im Bezug auf Wachstumskinetik, Differenzierungspotential und Phänotyp ähneln, dass aber das Gewebe aus dem Abdomen zu einer höheren Zellausbeute führt. Die Isolation aus Fettgewebe hat gegenüber der aus Knochenmark einige Vorteile. Fettgewebe ist leicht und mit einer geringen Belastung für den Patienten zu isolieren, führt zu einer deutlich höheren Zellausbeute und ist selbsterneuernd. Die Nomenklatur der Stammzellen aus Fettgewebe ist in der Literatur derzeit noch nicht einheitlich, sie wurden als adipose-derived stem/stromal cells (ASCs), adipose-derived adult stem cells (ADAS), adipose-derived stromal cells (ADSCs), adipose mesenchymal stem cells (AdMSCs), Lipoblasten, Preadipozyten oder prozessiertes Lipoaspirat (PLA) [Gimble et al., 2007] bezeichnet.

Im Allgemeinen werden MSC prinzipiell durch drei Eigenschaften charakterisiert: 1. durch ihre Adhärenz zu Plastik, 2. durch die Expression bestimmter Oberflächenmarker (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166) sowie das Fehlen der hämatopoetischen Marker CD34, CD45 und CD14 und 3. der Fähigkeit, zumindest in die adipogene, chondrogene oder osteogene Linie differenzieren zu können. In Bezug auf die Markerexpression fällt auf, dass zu Beginn der Kultur nicht alle Marker gleichmäßig exprimiert werden. Die Heterogenität nimmt mit der Kultivierungsdauer ab, was auf einen Einfluss der Kulturbedingungen oder der Zeit der Kultur schließen lässt [Mageed et al., 2007]. Frisch isolierte ASC unterscheiden sich von den kultivierten Zellen leicht, da CD105 und CD166 nur sehr gering auf den frischen ASC exprimiert sind [Jurgens et al., 2007]. Die Expression von CD105 und 166 steigt mit jeder Passage an, ebenso verhält es sich mit CD29, CD73 und CD90 [Mitchell et al., 2006]. Andere Marker, wie CD34 oder CD146, nehmen mit der Zeit in Kultur ab. CD34 ist später sogar gar nicht mehr nachweisbar [Mitchell et al., 2006; Varma et al., 2007]. Hinzu kommt, dass das Glykoprotein CD34 nur auf ASC [McIntosh et al., 2006] und nicht auf MSC nachgewiesen wurde [Pittenger et al., 1999]. Ähnlich verhält es sich mit dem Marker CD146, einem Marker für endotheliale Zellen und Perizyten, der über die Zeit der Zellen in Kultur sinkt. Andere Marker sind sehr unterschiedlich in der Literatur beschrieben, CD31 ist beispielsweise solch ein Marker. Einige Gruppen haben beschrieben, dass MSC negativ für CD31 sind [Varma et al., 2007], während andere den Marker in einigen Isolationen

nachweisen konnten [Mitchell et al., 2006].

Für den Einsatz in der regenerativen Medizin und im Tissue Engineering sollten die Stammzellen einige Kriterien erfüllen. Zuerst sollte eine ausreichende Menge an Stammzellen zur Verfügung stehen. Diese sollten mit minimal invasiven Verfahren gewonnen werden können, wobei Good Manufacturing Practice (GMP) Bedingungen eingehalten werden sollten. Außerdem müssen die Stammzellen in verschiedene Gewebetypen ausdifferenzieren können, wobei es wichtig ist, dass die Differenzierung steuerbar und reproduzierbar ist. Zuletzt sollte die Transplantation der Stammzellen in den Empfänger sicher sein [Gimble et al., 2007].

1.2. Heterogenität mesenchymaler Stammzellen

Unterschiede in der Markerexpression weisen darauf hin, dass ASC aus einer heterogenen Mischung von Zelltypen bestehen, was in aktuellen Studien auch gezeigt wurde. Zuk et al. [2001] beschrieben ASC als Population, die aus mesodermalen Zellen mit einer geringen Kontamination von endothelialen Zellen, Perizyten und glattmuskulären Zellen besteht. Außerdem sind in der Literatur sehr unterschiedliche Ergebnisse bzw. starke Schwankungen bei den Ergebnissen zu der Analyse von ASC zu finden. Die Unterschiede der MSC zwischen verschiedenen Publikationen können mehrere Ursachen haben, die durch das Fehlen eines allgemeinen Standards und einer genauen Charakterisierung zustande kommen. Zum einen werden in verschiedenen Gruppen unterschiedliche Isolationsmethoden angewendet, zum anderen sind die Kulturbedingungen, insbesondere die Zusammensetzung des Kulturmediums, nicht einheitlich. Dadurch werden unterschiedliche Zellen begünstigt und somit selektiert [Ho et al., 2008; Wagner und Ho, 2007]. Außerdem können das Alter oder der Body Mass Index (BMI) eine Rolle spielen. So beschreibt z.B. Van Hamelen et al. [2003], dass die Kapazität der ASC zu differenzieren negativ mit dem BMI korreliert. Außerdem wurde der Einfluss der Liposuktions-Entnahmestelle und der Art der Liposuktion untersucht [Oedayrajsingh-Varma et al., 2006].

Um die Heterogenität der MSC zu reduzieren, wurden bereits einige Ansätze mittels Antikörper basierender Verfahren gemacht. Beispielsweise wurde die immunomagnetische Isolierung (MACS) von Zellen verwendet, wobei die mit Antikörper markierten Zellen über magnetische Beads von den restlichen Zellen getrennt werden. Zur Reduzierung der Heterogenität können zum einen die positive Selektion nach z.B. CD49a, CD105 oder CD271, und zum anderen eine negative Selektion mit CD34 durchgeführt werden. CD49a⁺

Fractionen weisen beispielsweise das gleiche Differenzierungspotential wie klassisch isolierte MSC auf und können in osteogene und chondrogene Richtung differenzieren [Deschaseaux et al., 2003]. Außerdem weist diese Fraktion eine erhöhte Expression von CD90 und CD105 sowie eine verminderte Expression von CD146 auf [Rider et al., 2007]. CD105⁺ Zellen besitzen ebenfalls die gleichen Charakteristika wie MSC [Jarocha et al., 2008; Mageed et al., 2007; Wong et al., 2008], exprimieren die Marker CD44, CD29, CD90, CD106 (aber nicht CD14, CD31, CD34 und CD45), und können in osteogene, chondrogene und adipogene Zelltypen differenzieren [Aslan et al., 2006]. Die CD105⁺ Fraktion hat außerdem eine homogenere Morphologie und eine höhere Proliferation, sowie eine bessere chondrogene Differenzierungsfähigkeit gegenüber den nicht selektierten ASC. Ebenso verhält es sich bei der Differenzierung in Hepatozyten [Banas et al., 2008]. Eine weitere Selektionierung von ASC beruht auf CD271 [Battula et al., 2008; Jarocha et al., 2008]. Im Vergleich zu CD105⁺ Zellen haben CD271⁺ Zellen eine niedrigere Kontamination mit hämatopoetischen CD45⁺ Zellen. Die magnetische Aufreinigung zum Ausschluss von CD31 positiven Zellen wurde verwendet, um endotheliale Vorläuferzellen zu entfernen [Hutley et al., 2001; Miranville et al., 2004; Sengenès et al., 2007]. Als weitere Möglichkeit für die Trennung der Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker wurde die Zellsortierung im Durchflusszytometer verwendet.

1.3. Die Stammzellnische

Für die Identität, Differenzierung oder Proliferation ohne Differenzierung spielen viele Faktoren eine Rolle. Geprägt werden Stammzellen auch durch ihre direkte Umgebung. Die Stammzellnische bezeichnet eine lokale Umgebung, in der die Zellen in einem undifferenzierten Zustand vorliegen.

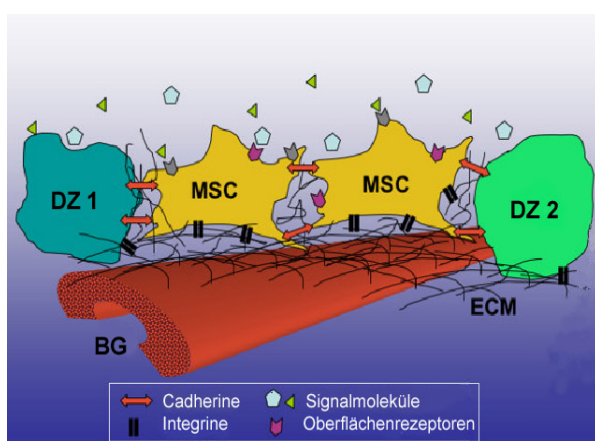


Abb. 1 Die mesenchymale Stammzellnische; mesenchymale Zellen (MSC) sind in ihrer mutmaßlichen perivaskulären Nische dargestellt. Dabei interagieren die MSC mit verschiedenen differenzierten Zellen (DZ 1, DZ 2) durch Adhäsionsmoleküle wie Cadherine, die extrazelluläre Matrix (ECM), vermittelt durch Integrine, und Signalmoleküle, die autokrine, parakrine und endokrine Faktoren einschließen können. (BG = Blutgefäß) [modifiziert nach Kolf et al., 2007].

Zu der Nische gehören auch alle Elemente, welche die Stammzellen unmittelbar umgeben. Dabei werden die Interaktionen der Stammzelle mit ihrer Mikroumgebung untersucht. Der Untersuchung liegt die These zugrunde, dass Organe einen Mechanismus besitzen, der bei der natürlichen Erneuerung (Homeostase = physiologisches Streben nach Einhaltung eines Gleichgewichts, das für die Lebenserhaltung und Funktion eines Organismus oder eines Organs notwendig ist) oder durch Schädigung verlorene Zellen ersetzt. Die Stammzellnischen bestehen zusätzlich zu den Stammzellen aus einer Mischung von verschiedenen (differenzierten) benachbarten Zellarten, so dass eine Umgebung entsteht, die die extrazelluläre Matrix und verschiedene lösliche Faktoren bereitstellt. Integrine und Adhärenzkontakte (adherence junctions; AJ) spielen eine große Rolle bei der Erhaltung der

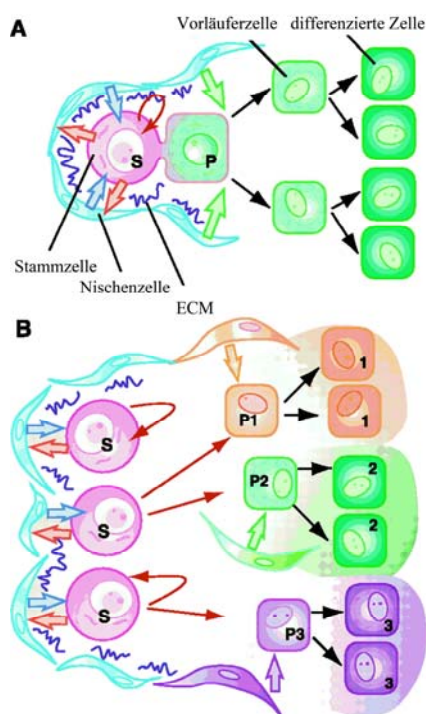


Abb. 2 Alternative Modelle für die Stammzellentwicklung;

A) unveränderliche Asymmetrie: asymmetrische Teilung in Progenitorzelle (P) und Stammzelle (S).

B) Die Stammzellen bringen Tochterzellen hervor, die entweder Stammzellen oder Vorläuferzellen werden können [modifiziert nach Watt und Hogan, 2000]

Umgebung der Nische, dem Zusammenhalt und dem Proliferationsstatus von epithelialen Zellen im Gewebe. Auf die in der Nische im undifferenzierten Ruhezustand vorliegenden Stammzellen wirkt ihre direkte Umgebung wahrscheinlich hemmend auf die Proliferation und die Differenzierung. Zwei Theorien befassen sich mit der Funktion der Nische. Die erste Theorie besagt, dass ein konstanter Fluss von sich langsam teilenden Stammzellen in der Nische aufgenommen wird, bei oder nach der Teilung verdrängt wird und die Verbindung mit der Nische verliert. Die zweite Theorie postuliert in Ruhe in der Nische vorliegende Stammzellen, die durch aktive Signale von außen, beispielsweise bei der Antwort auf eine Verletzung, aktiviert werden. Bei der Entwicklung liegt die erste Theorie näher, während in adultem Gewebe die Zweite wahrscheinlicher sein könnte [Fuchs et al., 2004]. Zwei alternative Modelle zur Entwicklung der Stammzellen in der Nische sind zum einen die asymmetrische Teilung der Stammzelle in eine Stamm- und eine Tochterzelle, die differenziert und zum anderen die Teilung in Tochterzellen, die entweder eine Stammzelle oder eine festgelegte Vorläuferzelle werden können [Watt und Hogan, 2000].

In der Signaltransduktion der Nische treten besonders die Signalmoleküle des Notch-, des Wnt- und des BMP/TGF

Weges (Knochenmorphogenetisches Protein/ Transformierender Wachstumsfaktor) in den Vordergrund. In der Stammzellnische werden die Stammzellen durch die Bioaktivität von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die an extrazelluläre Matrixproteine binden, aktiviert [Yanming Bi et al., 2007].

1.4. Extrazelluläre Matrix

Wechselwirkungen mit der unmittelbaren Umgebung beeinflussen alle Zellarten in einem gewissen Rahmen bereits bei der embryonalen Entwicklung. Während der Entwicklung der Niere im Embryo von Säugetieren entstehen drei Vorstufen: Pronephros (Vorniere), Mesonephros (Urnier) und Metanephros (Nachnieren). Aus der Nachnieren entwickelt sich die eigentliche Niere. Dabei interagiert undifferenziertes (metanephrogenes) Mesenchym mit der epithelialen Ureterknospe. Das Mesenchym differenziert in einen epithelialen Phänotyp mit den Glomeruli und proximalen und distalen Tubuli, während die Ureterknospe in die

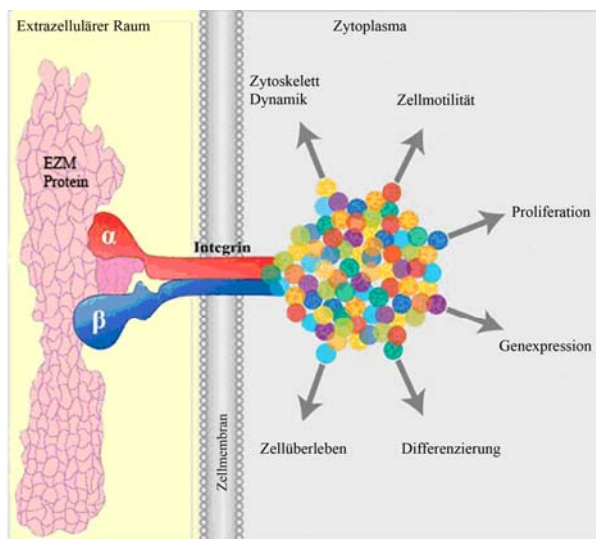


Abb. 3 Schematisches Modell der fokalen Adhäsion; fokale Adhäsionen sind Stellen, wo die heterodimeren Integrin-Rezeptoren mit den Proteinen der extrazellulären Matrix und einer Kaskade von Integrin-, Membran-, Aktin- und Signalassozierten Molekülen (bunte Punkte) verankert sind. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Zellmotilität und zytoskelettärer Dynamik und überbringen Informationen zur Regulation der Zellproliferation, Differenzierung, Genexpression und Überleben über die Zellmembran [modifiziert nach Docheva et al., 2007].

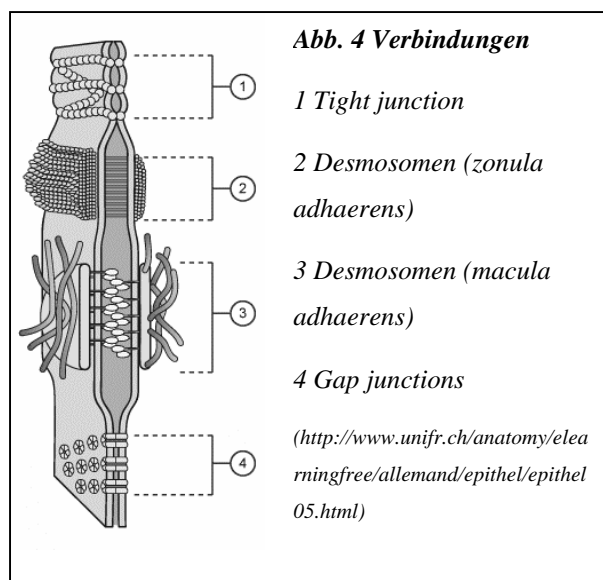
Sammelrohre, das Nierenbecken mit den Nierenkelchen und den Ureter differenziert [Wallner et al., 1998]. Während der Entwicklung des Metanephros werden verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM) exprimiert. Zum einen handelt es sich dabei um mesenchymale Proteine wie interstitielle Collagene, Tenascin, Nidogen und Fibronectin, zum anderen um Glykoproteine der integralen Basalmembran (Collagen IV (Col IV), Laminin, Proteoglykan, Tubulointerstitial Antigen (TIN-Ag)). Laminin, eine der Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix, ist eines der ersten ECM Proteine, das in der Embryogenese exprimiert wird. Auf der Oberfläche induziert Laminin Signale, die Zelladhäsion, Wachstum und Migration fördern [Xu et al., 2001]. Die Basalmembran steht im Kontakt mit epithelialen,

endothelialen, Fett- und glattmuskulären Zellen. Sie dient als Untergrund für die Gestaltbildung des Gewebes, stellt Signale für die Proliferation und Differenzierung von Zellen zur Verfügung, unterstützt die Erhaltung von differenziertem Gewebe und erhöht die Reparaturmechanismen nach einer Verletzung. Die extrazelluläre Matrix erfüllt somit strukturelle sowie biologische Funktionen. Zu den strukturellen Funktionen zählen der Aufbau eines Gerüsts, die Zugfestigkeit des Gewebes, die Dämpfung bei Knorpeln, der molekulare Filter in der Niere und die Bildung einer Grenze zwischen unterschiedlichen Gewebearten. Zusätzlich dient die ECM als Speicherort für Chemokine und Zytokine. Biologisch gesehen schafft bzw. erhält die ECM die Zellpolarität, interferiert in der Zelladhäsion, spielt eine Rolle bei der Morphogenese und Differenzierung, der Migration und der Proliferation. Außerdem bewahrt die ECM die Zellen vor Apoptose (in diesem Fall Anoikis: eine Form der Apoptose, die durch das Ablösen der Zellen von der Matrix ausgelöst wird [Shimony et al., 2008]). Die Adhäsion der Zellen an der Basallamina wird hauptsächlich über Integrine vermittelt. Zu den Bestandteilen der Matrix gehören Collagene, Proteoglykane, Adhärenzproteine, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine. Normalerweise ist die extrazelluläre Matrix sehr dünn, nur aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor konnte sie in größerer Menge isoliert werden. Dieser dient als Grundlage für Matrigel, einem Material zur Simulierung der Basalmembran in der Zellkultur. Laminin ist dabei einer der Hauptdifferenzierungsfaktoren für Zellen im Matrigel (56%). Zusätzlich enthält Matrigel Collagen IV (31%) und Entactin (8%), sowie den basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF), den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den Insulin ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), den von Plättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF), den Nervenwachstumsfaktor (NGF) und den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β). Bei der dreidimensionalen (3D) Kultur in Matrigel verbinden sich die Zellen in der Regel miteinander und bilden Strukturen, die denen im Ursprungsgewebe ähneln [Kleinmann et al., 2003, 2005]. Sertoli Zellen sind zum Beispiel mehr säulenartig und formen große drüsenähnliche Strukturen mit einem Lumen, wenn sie in Matrigel kultiviert werden [Hadley et al., 1985]. Matrigel wurde schon von einigen Gruppen bezüglich der Differenzierung und Erhaltung von Zellen verwendet. Taub et al. [1990] untersuchten die renale Tubulogenese unter dem Einfluss von den Wachstumsfaktoren EGF und TGF α im Mausmodell. Dabei wurden Maus-Nierenzellen auf Matrigel kultiviert und ausdifferenziert, was nur unter der Zugabe von EGF oder TGF α erreicht werden konnte.

1.5. Epithelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Differenzierung von ASC in Epithelzellen untersucht. Trotz der in den letzten Jahren beschriebenen vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten von ASC in unterschiedliche Zelltypen, konnte die epitheliale Differenzierung bisher nur einmal gezeigt werden. Vorangehende Studien unserer Arbeitsgruppe wiesen nach, dass all-trans-Retinolsäure (ATRA) oder konditioniertes Medium die Differenzierung in die epitheliale Richtung induzieren, was aber ausschließlicly durch die Expression von Zytokeratin 18 belegt wurde [Brzoska et al., 2005; Baer et al. 2009].

Epithelzellen sind polarisierte Zellen, die eine selektiv durchlässige Barriere für die Diffusion von Ionen und Makromolekülen bilden. Das Epithelgewebe besteht aus eng aneinanderliegenden, flächenhaft angeordneten Zellen, die die gesamte Körperoberfläche überziehen. In der Niere liegen die Epithelien in einer kubischen Anordnung vor. Die Oberfläche der Epithelien grenzt an das Außenmedium (apikale Seite), während die gegenüberliegende basale Seite auf der Basalmembran aufsitzt [Biologie, Campbell, Spektrumverlag, Kapitel 36, 2000]. Mikrovilli auf der apikalen Seite dienen der Vergrößerung der Oberfläche und führen dadurch zu einer Verbesserung des Stoffaustausches. Die verschiedenen Kontakte (junctions) erfüllen unterschiedliche Aufgaben. Die Verschlusskontakte (tight junctions; TJ) sind undurchlässige Verbindungen, die den



interzellulären Molekülaustausch verhindern. Außerdem dienen die TJ dem Zusammenhalt zwischen zwei Zellen [<http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/epithel/epithel05.html>]. Anders die Kommunikationskontakte (gap junctions), die chemische und elektrische Signale zwischen benachbarten Zellen durchlassen. Sie bestehen aus einer Reihe kleiner Kanäle, die durch Connexine aufgebaut sind. Dabei handelt es sich um je zwei gegenüberliegende Transmembranproteine,

die in sechser Anordnung einen röhrenförmigen Kanal mit einem Durchmesser von etwa 15-20 Å bilden, das Connexon. Diese Pore kann sich je nach Bedarf öffnen und schließen, wenn z.B. eine erhöhte Ca^{2+} Konzentration zu einer Konformationsänderung führt. Andererseits

sind Desmosomen Haftverbindungen, die zur Formerhaltung und für den interzellulären Zusammenhalt dienen. Sie verbinden eine Zelle und ihr Zytoskelett mit einer Nachbarzelle und kommen in Epithelzellen sowie in Herzmuskelzellen vor. Die Plasmamembranen von zwei benachbarten Zellen nähern sich auf diese Weise bis auf einen Abstand von ca. 30nm. Hemidesmosomen verbinden die Zelle mit der Basallamina und werden von Epithel- und Endothelzellen exprimiert. Die Bindung an die Basalmembran erfolgt über Integrine. Die Adhärenzkontakte sind interzelluläre mechanische Verbindungen, die die Zellmembran und Elemente des Zytoskeletts in und zwischen Zellen verbinden [Biologie, Campbell, Spektrumverlag, Kapitel 7, 2000].

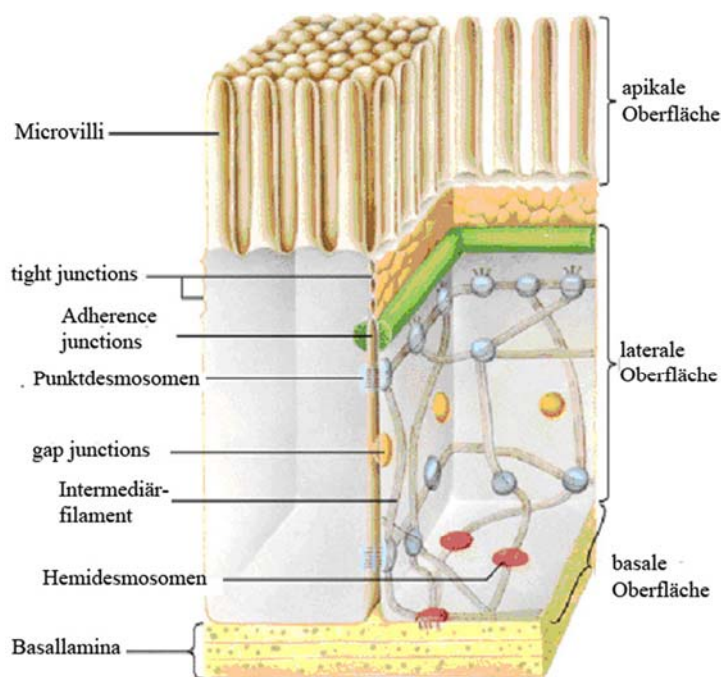


Abb. 5 Schematische Darstellung einer epithelialen Zelle mit den typischen Zell Verbindungen; die basale Oberfläche liegt auf der Basallamina, die aus einem Netzwerk von Collagenen und Proteoglykanen besteht. Auf der gegenüberliegenden Seite liegt die apikale Oberfläche. Die tight junctions sind direkt unter den Microvilli situiert und verhindern die Diffusion zwischen dem Lumen und Blut über den extrazellulären Raum zwischen zwei Zellen. Die gap junctions lassen den Austausch von kleinen Molekülen und Ionen zwischen dem Zytosol angrenzender Zellen zu. Die adherens junction und die Desmosomen sind wichtig für Zell-Zell-Kontakt und Zell-Adhäsion [Quelle: <http://tainano.com/chin/Molecular%20Biology%20Glossary.htm>, modifizierte Abbildung].

1.7. Regeneration von Nierenschädigungen

Durch die Fortschritte in der Medizin kommt es zu immer längeren Wartelisten für eine Organtransplantation. Da die Sterblichkeit bei Langzeit-Dialyse-Behandlungen dabei recht

hoch ist, muss nach anderen Lösungen gesucht werden, um eine Wiederherstellung der Nierenfunktion zu erreichen. Die Anwendung von mesenchymalen Stammzellen in der Therapie von Nierenschädigungen ist bisher nur in geringem Maße verfolgt worden. Die akute Verletzung der Niere (acute kidney injury = AKI) ist in der Mehrzahl der Fälle reversibel und die Patienten erholen sich vollständig ohne klinische Konsequenzen. In einer geringen Anzahl von Fällen kommt es jedoch nur zu einer unvollständigen Genesung und die Patienten müssen an die Dialyse oder entwickeln eine chronische Nierenerkrankung (CKD). Bei den meisten Patienten mit einer chronischen Erkrankung kommt es zu Zellverlust, Akkumulation von extrazellulären Matrix Proteinen und schließlich der Entwicklung einer interstitiellen Fibrose (Umbau des Bindegewebes). Interstitielle Fibrose zeichnet sich durch die Zerstörung von renalen Tubuli und interstitiellen Kapillaren sowie einer Anhäufung von Proteinen der extrazellulären Matrix aus [Ricardo et al., 2005].

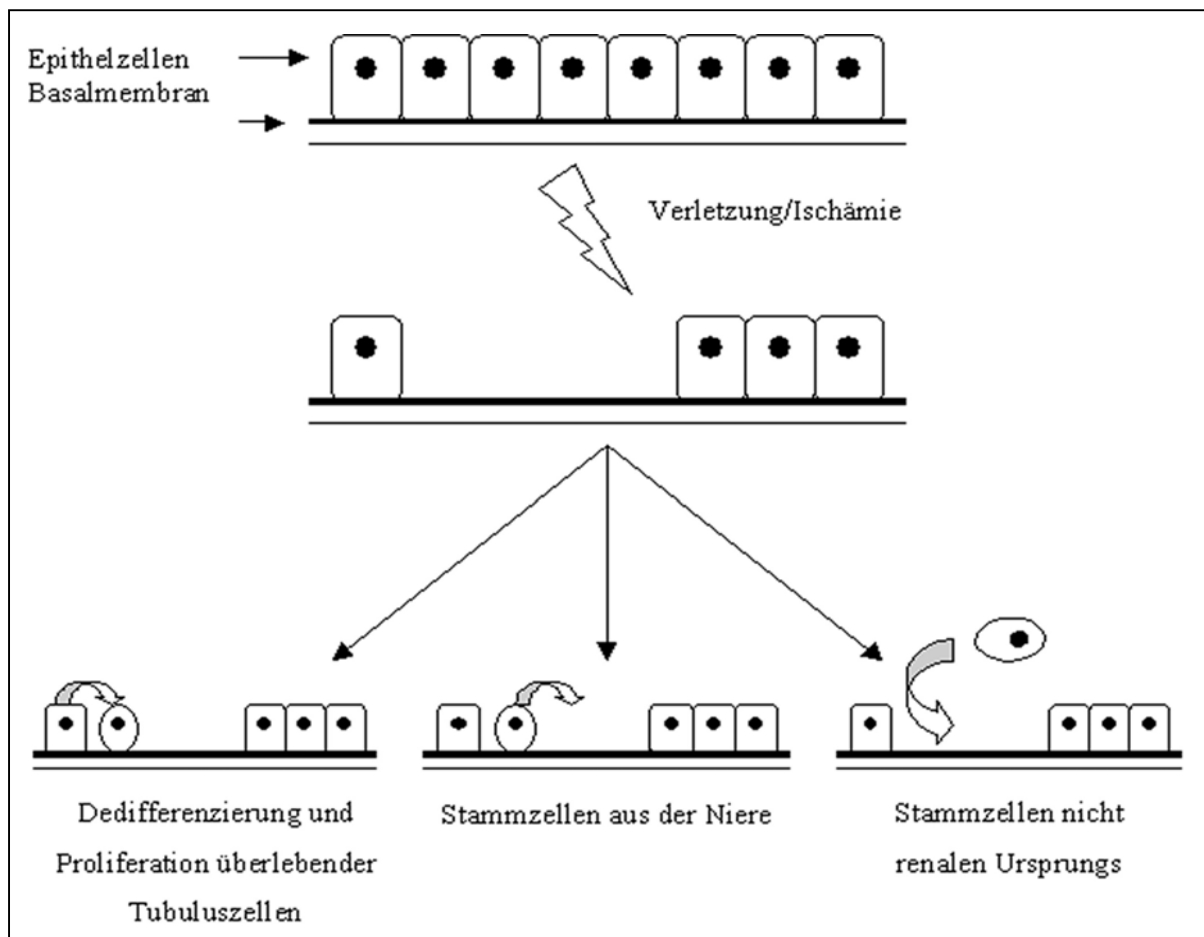


Abb. 6 Mögliche Mechanismen zur Reparatur des Nierenepithels nach Verletzungen; es sind drei grundsätzliche Mechanismen gezeigt, zum einen die Dedifferenzierung und Proliferation von Tubuluszellen, die Aktivierung von renalen Stammzellen aus der Nische und das Einwandern und Differenzieren von Zellen unbekannten Ursprungs, z.B. hämatopoetischen Stammzellen.

Bei der Regenerierung der Niere sind mehrere Mechanismen der tubulären Reparatur denkbar. Die Nachbarzellen könnten proliferieren und den Schaden damit schließen oder intrinsische Stammzellen könnten aktiviert und rekrutiert werden und differenzieren. Außerdem könnten auch Stammzellen von außen, z.B. mit dem Blut, zu der Schadensstelle gelangen und die Reparatur beeinflussen. Es könnte auch zu einer Transdifferenzierung kommen, wobei eine phänotypische Umwandlung einer Zelle in einen anderen Zelltyp stattfindet. Zum einen wird die epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) diskutiert, wobei glomeruläre und tubuläre Zellen ihren epithelialen Phänotyp verlieren und eine mesenchymale Gestalt annehmen, zum anderen die mesenchymale-epitheliale Umwandlung (MET).

In *in vivo* Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Therapie mit MSC zur Regeneration von Nierenschäden einen positiven Einfluss auf die renale Funktion hat, der genaue Wirkmechanismus konnte jedoch noch nicht geklärt werden [Imai et al., 2009; Maus: Herrera et al., 2004; Morigi et al., 2004; Ratte: Tögel et al., 2005]. In Ratten konnte die Mesangiolyse mittels MSC um 50% reduziert werden. Zudem wurde die intraglomeruläre Zellproliferation um das drei- bis vierfache gesteigert und die mesangiale Rekonstruktion beschleunigt. Die MSC integrierten dabei zu 20-50% in den Glomeruli (nicht aber in Tubuli), ohne dabei aber endotheliale, mesangiale oder monozytäre Marker zu exprimieren, wodurch ein parakriner Einfluss wahrscheinlich ist [Kunter et al., 2006]. Wong et al. (2008) hingegen haben die Differenzierung von humanen BM-MSK in Mesangiumzellen bei der Injektion in athymische Mäuse mit induzierter Glomerulonephropatie nachgewiesen, indem sie u.a. gezeigt haben, dass Zellen in der Niere positiv für humanes CD105 und Desmin, welches in mesangialen Zellen exprimiert wird, waren.

1.8. Regenerative Medizin

Der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen in der Regenerativen Medizin wurde in den letzten Jahren zunehmend untersucht. Im Allgemeinen ist die Forschung mit MSC aus dem Knochenmark schon weiter ausgereift als die Behandlung mit ASC. MSC sind durch ihre Eigenschaften in verschiedenen Gebieten der Regenerativen Medizin und des Tissue Engineering einsetzbar.

Der genaue Wirkmechanismus von ASC in der Therapie ist noch nicht geklärt, prinzipiell gibt es aber verschiedene Modelle. ASC könnten in das geschädigte Gewebe einwandern, integrieren und ausdifferenzieren. Des Weiteren könnten ASC eine Regenerierung über

parakrine Mechanismen induzieren, indem sie Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren. Die Stammzellnische kann durch eine Stimulierung von endogenen Stammzellen, die zur Proliferation oder Differenzierung angeregt werden, verändert werden, wodurch ebenfalls eine Genesung eingeleitet werden könnte. ASC könnten auch Antioxidantien, freie Radikalfänger oder Chaperone bzw. Hitzeschock Proteine und weitere toxische Substanzen aus der lokalen Umgebung entfernen und somit die Regeneration der überlebenden Zellen unterstützen [Gimble et al., 2007]. In der Literatur ist aber auch die Integration von Stammzellen in das Gewebe beschrieben worden [Poulsom et al., 2001; Wong et al., 2008]. Andere berichten, dass der Anteil der integrierten Zellen nicht ausreichen würde, um das Gewebe zu regenerieren [Tögel et al., 2005] oder dass keine integrierten Stammzellen nachgewiesen werden konnten, obwohl eine deutliche Regeneration des Gewebes eingetreten war [Bi, B et al., 2007].

Mesenchymale Stammzellen besitzen zusätzlich eine immunogene Aktivität, die durch niedrige Level an Haupt-Gewebeverträglichkeits-Antigenen der Klasse I (major histocompatibility complex (MHC)), keine Klasse II Antigene oder kostimulatorischen Molekülen ausgedrückt wird, wodurch die Zellen vor der Lyse durch Natürliche Killer (NK) Zellen geschützt sind. Die Kulturbedingungen können die Immunogenität allerdings beeinflussen. T-Zellen werden durch MSC inhibiert und in der G0/G1 Phase des Zellzyklus arretiert. Bei B-Zellen werden die Proliferation, die Migration und die Produktion von Immunglobulinen (IgM, IgA, IgG) gehemmt. Die NK-Zellen werden ebenfalls inhibiert und die Funktion der dendritischen Zellen sowie von Makrophagen und neutrophilen Zellen können gestört werden. Aufgrund ihrer Immunogenität sind MSC besser einzusetzen als embryonale Stammzellen, die humane Leukozytenantigene (human leukocyte antigens (HLA)) exprimieren und somit auch abgestoßen werden können [Wu et al., 2008]. MSC können auch bei der Behandlung von Entzündungen eingesetzt werden, wobei inflammatorische Zytokine wirken. Die MSC können in das entzündete Gewebe einwandern und auch lokale Stammzellen aktivieren oder unterstützen.

In der Reparatur von Schäden an Knochen- und Knorpelgewebe werden MSC eingesetzt [Lendeckel et al., 2004]. Auch bei der Behandlung von Herz- und Gefäßdefekten konnte ein regenerativer Effekt beobachtet werden: durch die Injektion von MSC konnte nach einem Myokardinfarkt eine verbesserte Herzfunktion festgestellt werden [Chen et al., 2004]. Ferner konnte epitheliales Gewebe regeneriert werden, wenn MSC zum Schliessen von Hautdefekten eingesetzt wurde [Rigotti et al., 2007]. Im Mausmodell konnte die Wundheilung durch eine erhöhte Re-Epithelialisierung und Angiogenese deutlich verbessert werden [Wu et al., 2007].

Die Behandlung des zentralen Nervensystems wurde bisher *in vitro* und in Tierversuchen untersucht. Die Differenzierung von humanen ASC in die neurale Richtung wurde *in vitro* induziert, diese Zellen wurden dann in das Gehirn von Ratten injiziert, wodurch die funktionalen Defizite verbessert werden konnten [Kang et al., 2003].

Einige klinische Anwendungen von ASC beinhalten die Therapie bei Steroid-refraktärer Graft-versus-Host-Reaktion (GVHD) [Fang et al., 2007], bei Schäden durch die Behandlung mit Bestrahlung [Rigotti et al., 2007], bei Defekten des Schädeldaches nach einer schweren Verletzung [Lendeckel et al., 2004], bei der Therapie von Lipoatrophie [Yoshimura et al., 2008] und beim Verschluss von Analfisteln verursacht durch Morbus Crohn [Garcia-Olmo et al., 2005] oder tracheomediastinal Fisteln [Alvarez et al., 2008]. Derzeit befinden sich einige klinische Studien, die mit Stammzellen aus Fettgewebe oder der stroma-vaskulären Fraktion therapieren, in der ersten oder zweiten klinischen Phase. Am häufigsten wird dabei die Anwendung im Verschluss von Fisteln verschiedenen Ursprungs untersucht. Des Weiteren werden Herzerkrankungen (z.B. Myokardinfarkt), fäkale Inkontinenz, die Regeneration der Leber und eingesunkene Narben mit ASC behandelt. Für den Einsatz bei der Lipodystrophie untersucht eine Studie die autologe Transplantation mit Liposuktionsmaterial, das mit ASC angereichert ist. Eine ähnliche Studie läuft zur Rekonstruktion von Brustdeformierungen nach einer Lumpektomie, wobei ebenfalls autologes Fettgewebe mit aus Fett stammenden regenerativen Zellen angereichert wird. Die stroma-vaskuläre Fraktion wird derzeit zur intravenösen Anwendung bei Diabetes Typ I und II getestet [Quelle der laufenden klinischen Studien: ClinicalTrials.gov, Stand 11.1.2010].

1.10. Fragestellung /Ziel

Die Differenzierung von Stammzellen in Epithelzellen *in vitro* ist nur in geringem Maße beschrieben worden, wobei die meisten Studien mit nicht-humanem Material und mit MSC oder ES durchgeführt wurden [Qian et al., 2008 (Ratte, MSC); Kim und Dressler, 2005 (Maus, ES)]. Die epitheliale Differenzierung von ASC ist kaum beschrieben worden. Eine ältere Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die Differenzierung von humanen ASC in die epitheliale Richtung durch all-trans-Retinolsäure induziert werden kann, obwohl dabei ausschließlich Zytokeratin 18 als epithelialer Marker verwendet [Brzoska et al., 2005]. Eine weitere Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass konditioniertes Medium von Tubuluszellen ebenfalls die Differenzierung in die epitheliale Richtung initiiert [Baer et al. 2009]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Differenzierung in epitheliale Tubuluszellen

über drei unterschiedliche Ansätze untersucht. Zelldifferenzierungen werden beeinflusst durch die extrazelluläre Matrix, ihre Nachbarn und die Versorgung, daher wurden diese drei Einflüsse im Hinblick auf ihren Anteil an der Differenzierung von ASC in Epithelzellen geprüft.

Zuerst wurde der Einfluss löslicher Faktoren verändert, indem dem Medium verschiedene chemische Faktoren und Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden. Dafür wurden u.a. Faktoren gewählt, die in der Entwicklung der Niere eine Rolle spielen oder von Tubuluszellen sezerniert werden.

Um den Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Differenzierung der ASC in Tubuluszellen zu untersuchen, wurden ASC auf spezifischen oder unspezifischen extrazellulären Matrices kultiviert. Um eine für epitheliale Tubuluszellen spezifische Matrix zu erhalten, wurden bis zur Konfluenz kultivierte Tubuluszellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst, ohne dass die extrazelluläre Matrix mitgelöst wurde. So entstand ein mit extrazellulärer Matrix von Tubuluszellen beschichtetes Kulturgefäß. Eine unspezifische Matrix stellt Matrigel dar, welches durch seine Zusammensetzung aus Laminin, Collagen IV, Entactin und weitere Faktoren eine Basallamina simuliert.

Ein Zusammenspiel verschiedener löslicher Faktoren und Nachbarzellen wurde durch die Co-Kultur von Tubuluszellen und ASC nachgeahmt. In indirekten Co-Kulturen, bei denen die beiden Zellarten durch eine Membran räumlich voneinander getrennt waren, teilten die Zellen das Medium und tauschten so zeitnah lösliche Faktoren aus. Die direkte Co-Kultur ging einen Schritt weiter und ermöglichte Zell-Zell-Kontakte zwischen Tubuluszellen und ASC. Diese Versuche sollten zeigen, ob lösliche Faktoren eine Differenzierung von ASC in Epithelzellen hervorrufen können oder ob der direkte Kontakt zu Epithelzellen notwendig ist. Die Co-Kultur kommt den *in vivo* Bedingungen nahe, da Zellkontakt und Versorgung simuliert werden.

Um das Zusammenspiel von den drei beeinflussenden Faktoren besser zu untersuchen, wurden weiterführende Versuche mit einer Kombination aus löslichen Faktoren im Medium und Co-Kultur bzw. der extrazellulären Matrix durchgeführt.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Heterogenität der ASC, die einen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der ASC ausüben könnte. Die Kontamination mit anderen Zellen, die nicht differenzieren können, könnte die Differenzierungsfähigkeit verschlechtern bzw. die Ausbeute an differenzierten Zellen verringern. Daher wurden zwei verschiedene Ansätze zur Reduktion der Heterogenität durchgeführt. Zum einen wurden die Zellen eine

Stunde nach der Isolation und dem Ausbringen in Kulturgefäße gewaschen, um langsamer adhätierende Zellen zu eliminieren. Zum anderen wurden mittels positiver immunomagnetischer Isolation bestimmte Zellen selektiert. Für die Selektion wurden die Marker CD49a, CD90, CD105 und CD271 ausgewählt, welche alle Bestandteil des allgemeinen Expressionsprofils von ASC sind. Es gilt, eine Reduktion der Heterogenität von ASC zu erreichen, um so den Anteil an differenzierungsfähigen Zellen zu erhöhen, die Zellausbeute dabei aber für einen möglichen Einsatz in der Therapie ausreichend zu halten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Technische Geräte

Gerät	Hersteller
Analysensieb (125 µm)	Retsch, Haan
Analysewaage	Mettler, Giessen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav (CertoClav CV-EL 10l/12l)	Kelomat Sterilizer Division
Brutschrank (BB 6060)	Heraeus, Hanau
Digitalkamera (Typ DFC 480)	Leica, Solms
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Coplin-Färbetrog	
Durchflusszytometer (FACScan)	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresegerät (Trans-Blot SD) (Western Blot)	Biorad, München
ELISA Reader (MR5000 Microplate Reader)	Dynatech
Fluoreszenzmeßgerät (FLUOStar)	BMG, Offenburg
Fluoreszenzmikroskop:	
AxioLab	Zeiss, Oberkochen
DSC480 DMRB	Leica, Solms
Heizblock	Grant Boekel BBA, Cambridge
Hypercassette	Amersham (GE Healthcare), Freiburg
Kippschüttler:	
Delfia Plateshake	Wallac (jetzt Perkin Elmer, Rodgau)
PMR-30	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer (Ikamag Reo)/Heizplatte	IKA-Labortechnik, Staufen
Mikroskop (Axiovert 10)	Zeiss, Oberkochen
MiniMACS System	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Neubauer Kammer	Assistent, Sondheim; Scherf Präzision, Meiningen-Dreissigacker

PCR Geräte:

AB7300	ABI, Darmstadt
Primus	MWG-Biotech, Ebersberg
RoboCycler Gradient 96	Stratagene, La Jolla, USA
pH-Meter 632	Metrohm, Filderstadt
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Rater- Elektronenmikroskop (Hitachi S-4500)	Hitachi, Krefeld
Sterilbank (Lamin Air HB 2448)	Heraeus, Hanau
Spectrophotometer (NanoDrop)	ThermoScientific, Epsom (UK)
Stromversorgung Elektrophorese (PowerPack 1000)	Biorad, München
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Vortex (V-530)	JASCO Labor- u. Patenttechnik, Groß-Umstadt
Waage (VF2)	IKA-Labortechnik, Staufen
Wasserbad K7T	Mettler, Giessen
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Mikro22R)	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Hereus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien**Material / Reagenz**

Blotpapier
 Cell Strainer
 Chamber Slides
 Combitips
 Dechgläser
 FACS Röhrchen (4ml)
 0,22µm Filter
 0,45µm Filter
 Glasflaschen

Hersteller

Schleicher und Schuell, Dassel
 BD Falcon, Heidelberg
 Nunc, Langenselbold
 Fischer/WS Laborservice
 Menzel Gläser, Braunschweig
 Greiner, Solingen
 Millipore, Millex
 Millipore, Millex
 Schott, Mainz

Inserts	BD Biosciences, Heidelberg
Kulturgefäße:	
12-/24- Loch Platten	Falcon, Heidelberg
6- Loch Platte	Falcon, Heidelberg; Greiner, Solingen
MACS Columns for large cells	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Maxisorb Platten	Fischer (Nunc), Langenselbold
Objektträger	Knittel Gläser, Braunschweig
Objektträger Super Frost	Menzel Gläser, Braunschweig
PCR 96- Loch Platten	ABgene, Epsom, UK
PCR Abdeckfolie	ABgene, Epsom, UK
PCR Tubes	VWR, Darmstadt
PVDF Membran (Transfermembran)	Millipore, Schwalbach
Quarzkuvette	VWR, Darmstadt
Röntgensfilm	Amersham, Freiburg
Spitzen	Starlab Ahrensburg
20ml Spritze	Braun, Melsungen
50ml, 15ml Tubes	Greiner, Frickenhausen
1,5 ml Tubes	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	Feather, Osaka
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien

Material / Reagenz	Hersteller
Aceton	Fischar, Saarbrücken
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Sigma, Hamburg
6-Aminohexansäure	Sigma, Hamburg
Ammoniak 33%	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Benzamidin	AppliChem, Darmstadt

Bovine serum albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt/BioRad, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citronensäure	AppliChem, Darmstadt
Collagen IV	Fluka (Sigma, Hamburg)
Collagenase Typ1	Worthington, Lakewood, NJ, USA
Coomassie Brilliant Blue	AppliChem, Darmstadt
Demecolcine solution	Sigma, Hamburg
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, Hamburg; Alexis, Lörrach
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma, Hamburg
Enhanced Chemiluminescence Substrate (ECL)	Amersham (GE Healthcare, Freiburg); Perkin Elmer, Waltham (USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Hamburg
Entwickler	Fisher/Sehner, Berlin
Eosin	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Applichem, Darmstadt
Eukitt	Kindler, Freiburg
Ficoll (Bicoll)	BiochromAG, Berlin
Fixierer	Fisher/Sehner, Berlin
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidinthiozyanat	Roth, Karlsruhe
G418	PAA, Parsching
Hämalaun	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	AppliChem, Darmstadt
HGF-ELISA Kit (Duo Set)	R&D Systems, Wiesbaden
Hexamethyldisilazan (HMDS)	Sigma, Hamburg
Isoamylalkohol	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Riedel deHaen, Seelze
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Naturaflor Töpfer, Dietmannsried
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
Matrigel Recovery Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Methanol	J.T. Baker, Griesheim; Fluka (Sigma, Hamburg)
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH 2M)	Merck, Darmstadt
Na-thiosulfat-pentahydrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
N-Ethylmaleimide (NEM)	Sigma, Hamburg
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	VWR, Darmstadt
Oil Red O	Sigma, Hamburg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Merck, Darmstadt
Reagenz S (Lowrytest)	Biorad, München
Reagenz A (Lowrytest)	Biorad, München
Reagenz B (Lowrytest)	Biorad, München
Rotiphenol	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Hamburg
sodium dodecylsulfate (SDS)	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt; Riedel de-Haen, Seelze
Standard Kaleidoscope Prestained (WB)	Biorad, München
Standard pBR322 DNA/ Alu1 (PCR)	Fermentas, St. Leon-Rot
Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma, Hamburg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka (Sigma, Hamburg)
Tri-Na-citrat-dihydrat	Roth, Karlsruhe
Triton-x-100	Sigma, Hamburg; AppliChem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Sigma, Hamburg
Trypanblau	Sigma, Hamburg

Tween 20	Merck, Darmstadt; Serva,
Urea	Roth, Karlsruhe
Xylol	J.T. Baker, Griesheim

2.1.4. Medien und Mediensupplemente

Substanz	Hersteller
Activin A	R&D Systems, Wiesbaden
Ampicillin	AppliChem
Ascorbinsäure	Sigma, Hamburg
All Trans Retinoic Acid (ATRA)	Sigma, Hamburg
α -Globulin	Grifols, Langen
bFGF basic Fibroblast Growth Factor	Strathmann, Hamburg
BactoAgar	BD, Heidelberg
Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7)	Cellsystems, St. Katharinen
CellTracker green CMFDA	Invitrogen, Karlsruhe
Collagen IV	Fluka (Sigma, Hamburg)
Dexamethason	Ratiopharm, Ulm
Dextran T500	Pharmacia (GE Healthcare)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma, Hamburg
EGF Endothelial Growth Factor	Gibco, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Biosource (Invitrogen, Karlsruhe)
Glucose	PAA, Cölbe
Glycerophosphat	Merck, Darmstadt
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	Merck, Darmstadt
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Immunotools, Friesoythe
Insuline Like Growth Factor (IGF-2)	Sigma, Hamburg
Indomethacin	Immunotools, Friesoythe
Insulin-Selenin-Transferin (ITS)	Fluka (Sigma, Hamburg)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Karlsruhe
Matrigel	Gibco, Karlsruhe
Medium 199	BD Biosciences, Heidelberg
Keratinocyte Growth Factor (KGF)	PAA, Cölbe; Sigma, Hamburg
	Immunotools, Friesoythe

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Ziegenerum	Immunotools, Friesoythe unbekannt
---	--------------------------------------

2.1.5. Material für Molekularbiologie

Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
GelRed	Biotrend, Köln
Glutaraldehyd	Sigma, Hamburg
Magnesiumchlorid (MgCl)	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmidaufreinigungkit	Machery Nagel, Düren
10×Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Random Hexamer	Applied Biosystems, Foster City
Reverse Transcriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
SybrGreen Rox Mix	Thermo Scientific; ABgene, Epsom
Taq Polymerase	Peqlab, Erlangen
	Invitrogen, Karlsruhe
Topo TA kloning kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6. Antikörper

2.1.6.1. Primärantikörper

Material / Reagenz	Hersteller
CK18	Dako, Glostrup; EXBIO, Prag
Desmin	Biozol, Eching
panCK	Dako, Glostrup
PanCK FITC	Sigma, Hamburg
smA	Dako, Glostrup
ZO-1	BD transduction, Heidelberg
CD10 PE	Immunotools, Friesoythe
CD13 FITC (1mg/ml)	Immunotools, Friesoythe
CD26 PE	BD Biosciences- Pharmingen, Heidelberg
CD29 FITC	Immunotools, Friesoythe
CD31 FITC	Immunotools, Friesoythe

CD34 PE	Immunotools, Friesoythe
CD44 FITC	Immunotools, Friesoythe
CD49a (0,5mg/ml)	BD Biosciences- Pharmingen, Heidelberg
CD73 (0,5mg/ml)	BD Biosciences- Pharmingen, Heidelberg
CD90	e-biosciences, Lab Vision,
CD90 (0,2 mg/ml)	dianova, hamburg
CD105	Immunotools, Friesoythe
CD105 FITC	Immunotools, Friesoythe
CD146 (1mg/ml)	AbD Serotec, Düsseldorf
CD166 PE	BD Biosciences- Pharmingen, Heidelberg
CD271	BD Pharmingen, Heidelberg
CD271-APC	Milenyi, Bergisch Gladbach

2.1.6.2. Sekundärantikörper

Material / Reagenz	Hersteller
Gam Cy3 Anti Mouse	Jackson Immuno Research, Newmarket
Gam FITC anti Rabbit	Boehringer, Ingelheim
Gam FITC Anti Mouse	Jackson Immuno Research, Newmarket
PE (Phycoerythrin) goat F(ab)2 anti-mouse	R&D Systems, Wiesbaden
IgG1 MicroBeads	Milenyi, Bergisch Gladbach
IgG2 MicroBeads	Milenyi, Bergisch Gladbach
Anti APC MicroBeads	Milenyi, Bergisch Gladbach

2.1.7. Primer

Aquaporin 1	gtccaggacaacgtgaaggt aaggaccgagcagggttaat	NM_198098	455 bp
β-Aktin	forward actggaacggtgaaggtgac reverse agagaagtggggtggctttt	NM_001101.2	169 bp
β-Aktin	forward ctcttcacgcttcctcct reverse ctcaagttgggggacaaaaa	NM_001101.2	842 bp
Desmin	forward ctgagcaaaggggttctgag reverse cttcaggaggcagtgaggac	NM_001927	176 bp

E-Cadherin	forward tgcccagaaaatgaaaaagg reverse gtgtatgtggcaatgcgttc	NM_004360	200 bp
Nestin	forward tccaggaacggaaaatcaag reverse gcctcctcatccctacttc	NM_006617	120 bp
Occludin	forward tccaatggcaaagtgaatga reverse gcaggtgctcttttgaagg	NM_002538	170 bp
Oct-4	forward gtactcctcggtcccttcc reverse caaaaaccctggcacaact	NM_002701	168 bp
sall-1	forward acgtccaagcttcagcaact reverse tccccagtgtgtcctgta	NM_002968	131 bp
six-2	forward ctcaccaccacacaggtcag reverse cgggttggtgctgtagaat	NM_016932	114 bp
smA	forward acccacaatgtcccatcta reverse gaaggaatagccacgctcag	NM_001613	123 bp
wnt-4	acatgcaacaagacgtccaa reverse aagcagcaccagtggaattt	NM_030761	122 bp
Zona occludens 1 (ZO-1)	forward gaacgaggcatcatccctaa reverse gagcggacaaatcctctctg	NM_003257	163 bp
Zona occludens 2 (ZO-2)	forward gggatattgcaggcacagtt reverse cgctgtctcccttcttgaac	NM_004817	174 bp
Zytokeratin18	forward cacagtctgctgaggttgga reverse caagctggccttcagatttc	NM_000224	110 bp
Zytokeratin 18	forward gcatccagaacgagaaggag reverse ctgagattgggggcatcta	NM_000224.2	503 bp

2.2. Methoden

2.2.1. Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen

Phosphate buffered saline (PBS)

- 0,8% NaCl
- 0,116% Na₂HPO₄
- 0,02% KH₂PO₄
- 0,02% KCl

in dH₂O, pH 7,4

Paraformaldehyd (PFA) 1 %

- 0,5g PFA in 1ml NaOH aufnehmen
- 500µl 5M HCl hinzufügen
- ad 20ml PBS
- pH 7,4 einstellen

ad 50ml PBS

2.2.2. Zellkultur

In der Zellkultur wurden ausschließlich sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Lösungen wurden mit 0,22 oder 0,45µm Filtereinheiten mit niedriger Proteinbindungskapazität sterilfiltriert.

Stammzellen aus Fettgewebe wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) (DF 10%) in Gas durchlässigen 75cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Für die Tubuluszellen wurde zur Kultivierung Medium 199 (M199) mit 10% FKS Gehalt verwendet. Die Temperatur im Brutschrank betrug 37°C und der CO₂-Gehalt lag bei 5%.

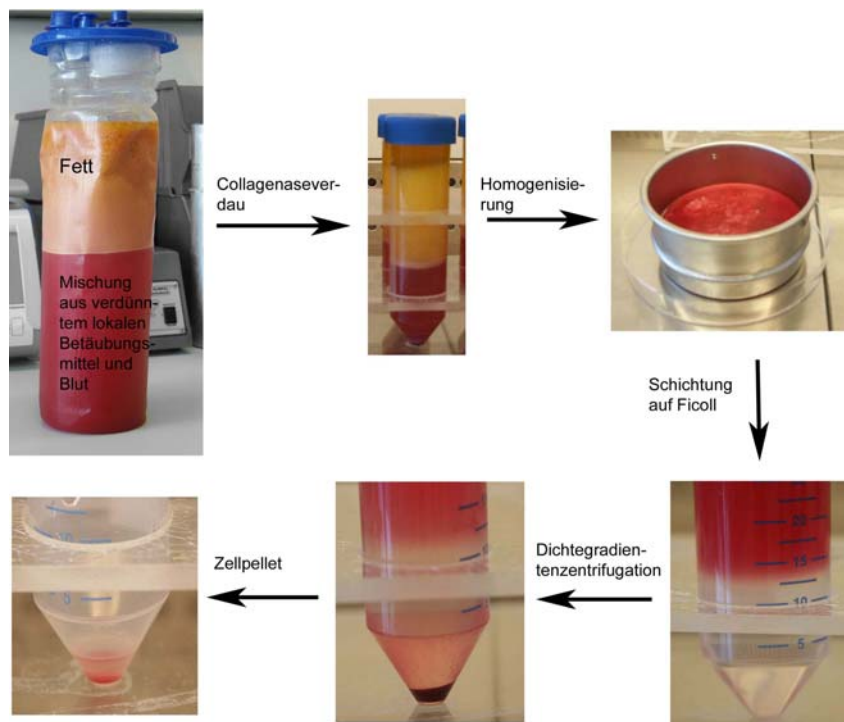
2.2.2.1. Isolierung von Stammzellen aus Fettgewebe

Lösungen:

- Enzymlösung 0,45% Collagenase Typ 1 in PBS
- NaCl

- Ficoll
- PBS
- Kulturmedium (DF 10% und Penicillin-/Streptavidinlösung (Pen/Strep) 1:250)

Von dem Fettgewebe aus Liposuktionsaspiraten wurden je ca. 30ml in acht 50ml Röhrchen gef llt. Danach wurden zu dem Gewebeprei je 2,5ml Enzymlösung und 12,5ml PBS hinzugefügt. Unter Schütteln wurde das Fettgewebe für 45 – 60min im Wasserbad bei 37 C



inkubiert; zusätzlich wurden die Röhrchen mehrfach manuell geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 300 g für 5min zentrifugiert. Die Pellets wurden in einem neuen 50ml Röhrchen gesammelt. Dieser Schritt der Zentrifugation und Pelletaufnahme wurde zweimal wiederholt und die gesammelten Pellets wurden anschließend bei 300 g für 5min

Abb. 7 Übersicht über den Ablauf der Isolation von adipose-derived stromal cells aus Liposuktionsaspirat

zentrifugiert und mit NaCl gewaschen. Das Pellet wurde in 20ml NaCl aufgenommen und zur Homogenisierung durch ein 125 m Sieb gefiltert. Um Erythrozyten und Granulozyten von den mononuklearen Zellen zu trennen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dabei wurde die homogenisierte Zelllösung vorsichtig auf Ficoll geschichtet und für 20min bei 400 g ohne Bremse zentrifugiert, so dass sich die Schichten nicht vermischten. Nach der Zentrifugation ergaben sich vier Schichten (von oben nach unten): Plasma, mononukleare Zellen, Ficoll und als Pellet Erythrozyten und Granulozyten. Die milchige Phase der mononuklearen Zellen enthielt die ASC. Diese wurde vollständig abgenommen und in ein neues 50ml Röhrchen überführt. Die Probe wurde mit NaCl aufgefüllt und bei 300 g für 5min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 12ml DF 10% + Pen/Strep aufgenommen und in eine 75cm² Zellkulturflasche überführt. Die

Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Innerhalb von drei Tagen wurde das Medium gewechselt, um nichtadherente Zellen und Zelldebris zu entfernen.

2.2.2.2. Immunomagnetische Separation

Lösungen:

- α -Globulin 1:20 in DMEM
- α -Globulin 1:100 in DMEM
- MACS-Puffer (EDTA 5mM, bovines Serumalbumin (BSA) 0,5% in PBS, pH 7,4)

Tab. 1 Antikörper für die Immunomagnetische Isolation

1. Antikörper	Isotypen-Unterklasse	Hersteller
CD49a	IgG1	BD Biosciences
CD90	IgG1	EBioscience
CD105	IgG2a	Immunotools
CD271	IgG1	BD Pharmingen
CD271-APC		Miltenyi, (CD271 (LNGFR) MicroBead Kit)
2. Antikörper		
MACS anti mouse IgG 1		Miltenyi
MACS anti mouse IgG 1		Miltenyi
APC MicroBeads		Miltenyi (CD271 (LNGFR) MicroBead Kit)

Die Zellen wurden nach der Fettisolation nicht ausgesät, sondern in α -Globulin 1:20 in DMEM aufgenommen und für 10min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über einen Cell Strainer gefiltert und in einer Neubauerkammer gezählt, während die Zellen bei 300×g für 5min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und der Primärantikörper (pAK) auf die Zellen gegeben. Die Konzentration des pAK wurde auf 0,5µg AK pro 10⁷ Zellen berechnet. Der Antikörper wurde in 1ml α -Globulin 1:100 in DMEM verdünnt und direkt auf das Zellpellet sterilfiltriert. Die Zellen wurden kurz gevortext und für 30min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 10ml MACS-Puffer aufgefüllt und abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden zu den 150-200µl Flüssigkeit, die im Röhrchen verblieben, 50µl Sekundärantikörper hinzugefügt. Dies entspricht einer Verdünnung von ca. 1:5. Die Zellen wurden kurz gevortext und für 20min bei

4°C inkubiert. Anschließend wurden erneut 10ml MACS-Puffer hinzugefügt, die Zellen wurden abzentrifugiert und in 2,5ml MACS-Puffer aufgenommen.

Zur Isolation wurden käufliche MACS Säulen (Columns for large cells) verwendet. Die Säulen wurden in einen Magneten eingehängt und mit 1ml MACS-Puffer äquilibriert. Wenn die Lösung nicht homogen war, wurden die gelösten Zellen nochmals filtriert und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 500µl MACS-Puffer gewaschen. Die nicht

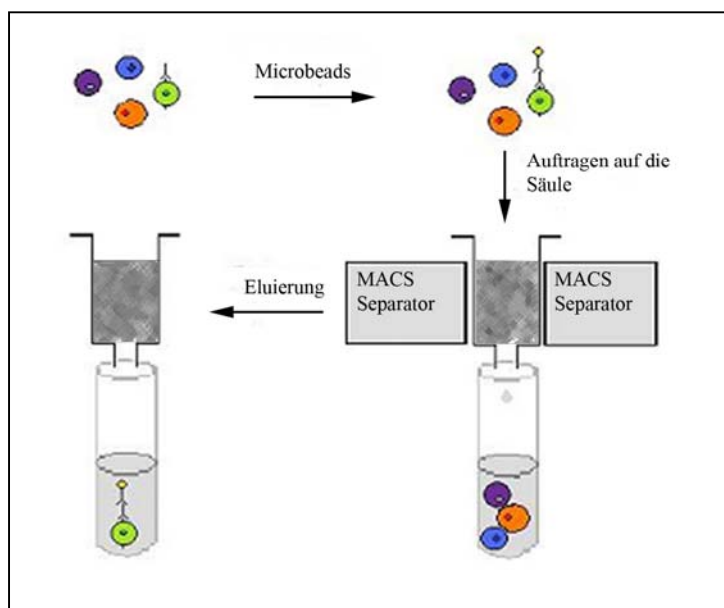


Abb. 8 Schema der immunomagnetischen Isolation; die MicroBeads binden spezifisch über IgG an die Zellen und werden über einen MACS Separator, einen Magneten, in der Säule zurückgehalten. Nach der Entfernung des Magneten werden die markierten Zellen eluiert

markierten Zellen wurden in einem Röhrchen gesammelt und als Negativ-fraktion verwendet. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten genommen und die positive Zellfraktion wurde mit 1ml MACS-Puffer eluiert. Es folgte eine Zellzählung sowohl der Positiv- als auch der Negativfraktion mittels Neubauer-Zählkammer.

Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Pellet in DMEM + 10% FKS und 1:250 Pen /Strep aufgenommen und ausgesät.

2.2.2.3. Zellisolierung aus der Niere

Die humanen Tubuluszellen wurden bei uns im Labor aus Nierengewebe von Nephrektomien nach einem etablierten Protokoll [Baer et al., 1997] isoliert und mir für die Versuche zur Verfügung gestellt.

2.2.2.4. Umsetzen der Zellen

Lösungen:

- NaCl (0,9%, isotonisch)
- Trypsin/EDTA

- Kulturmedium (DMEM für ASC, Medium 199 für Tubuluszellen)

Zum Umsetzen der Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit einer isotonischen 0,9%igen NaCl-Lösung zweimal gewaschen. Um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen, wurden 1,5ml Trypsin in 75cm² Flaschen und 0,5ml Trypsin in 25cm² Flaschen sowie in 6-Loch Platten auf die Zellen gegeben, so dass der gesamte Boden bedeckt war. Die Zellkulturflasche bzw. -platte wurde für einige Minuten bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Wenn die Zellen sich gelöst hatten, wurden sie in 10ml Medium aufgenommen und bei 300×g für 5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen konnten nun in der gewünschten Konzentration geteilt und in neuen Kulturgefäßen ausgesät werden.

2.2.2.5. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Lösungen:

- Trypanblau

Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. In einer Neubauer-Kammer entstehen durch die Anordnung von mehreren Rillen 9 Großquadrate mit je einer Fläche von 1mm². Die Großquadrate sind ebenfalls in 16 kleinere Quadrate unterteilt und der Abstand zwischen dem Deckglas und der Zählkammer beträgt 0,1mm, woraus sich ein Volumen von 0,1mm³ pro Großquadrat ergibt, was 0,1µl entspricht. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen mit Trypanblau, einem anionischen Azofarbstoff, gefärbt. Der Farbstoff färbt nur tote Zellen blau, während Zellen mit einer intakten Membran nicht gefärbt werden. Zur Zählung musste die Zellsuspension so verdünnt werden, dass pro Großquadrat zwischen 20 und 120 Zellen gezählt wurden, da sich bei einer zu geringen Zellzahl zu große Abweichungen ergeben, während eine zu hohe Zellzahl nicht gut zählbar ist. Die Zellen wurden in vier Großquadraten ausgezählt, wobei die Zellen auf der oberen Linie und der linken Seitenlinie mitgezählt wurden. Mit der folgenden Formel wurde die Anzahl der Zellen pro Milliliter ermittelt.

$$N = \frac{x}{Z} * D * 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

Z = Zahl der Großquadrate

N = Anzahl lebender Zellen/ml

x = gezählte Zahl lebender Zellen

D = Verdünnungsfaktor

10^4 = Umrechnungsfaktor vom Volumen eines Großquadrates auf ml

Für das Aussäen der Zellen wurde die einzusetzende Menge an Zellsuspension berechnet.

$\frac{\text{gewünschteZellzahl} * 1000\mu\text{l}}{\text{Zellzahl}} = \text{einzusetzendeMenge}[\mu\text{l}]$
--

2.2.2.6. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Lösungen:

- Trypsin/EDTA
- Einfriermedium (7% Dimethylsulfoxid (DMSO), 20% FKS in Medium)
- Kulturmedium

Zum Einfrieren von Zellen wurde das für die Zellart verwendete Medium mit 7% DMSO und 20% FKS versetzt. Die Zellen wurden, wie beim Umsetzen vom Boden der Zellkulturflasche, gelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in der Einfrierlösung aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zuerst für einen Tag bei -80°C in einer Styroporbox langsam eingefroren, bevor sie dann in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert wurden.

Zum Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut, sofort in 10ml vorgewärmten Medium aufgenommen und in einem 15ml Röhrchen bei $300\times g$ für 5min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in Kulturgefäßen ausgesät.

2.2.2.7. Adipogene Differenzierung

Lösungen:

- Adipogenes Differenzierungsmedium:

DMEM
1µM Dexamethason
10% FKS
3500mg/dl Glukose
1mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)
200µM Indomethacin
Insulin-Selenin-Transferin (ITS) 1:100

Für die Induktion der adipogenen Differenzierung wurden ASC für 21d in adipogenem Medium kultiviert. Der Nachweis der adipogenen Differenzierung erfolgte über eine Oil-Red-O-Färbung.

2.2.2.8. Osteogene Differenzierung

Lösungen:

- Osteogenes Differenzierungsmedium:

DMEM
50µM Ascorbinsäure
0,1µM Dexamethason
15% FKS
10mM Glycerophosphat

Für die Induktion der Differenzierung in die Osteoblasten wurden die ASC für 21d in einem osteogenen Medium kultiviert. Der Nachweis wurde mittels Van Kossa-Färbung durchgeführt.

2.2.2.9. Oil-Red-O-Färbung

Lösungen:

- 1% PFA
- 0,5% Oil-Red-O-Lösung
- dH₂O

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit PFA fixiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit Oil-Red-O-Lösung. Die Zellen wurden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie unter dem Mikroskop angeschaut wurden. Die Oil-Red-O-Färbung macht die Anhäufung von Lipidtröpfchen in intrazellulären Vakuolen sichtbar, welche Anzeichen adipogener Differenzierung sind.

2.2.2.10. Van Kossa-Färbung

Lösungen:

- 70% Ethanol
- 5% Silbernitrat
- 0,3M Natriumthiosulfat-pentahydrat
- dH₂O

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Ethanol für 20 Minuten fixiert. Danach wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und für 60 Minuten bei RT mit Silbernitrat inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen für 5 Minuten mit Natriumthiosulfat inkubiert, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und sofort unter dem Mikroskop betrachtet. Der osteogene Phänotyp wurde dabei durch die Färbung von Calcium-Hydroxyapatit sichtbar.

2.2.3. Zellbiologie

2.2.3.1. Nachweis der Proliferation

Lösungen:

- NaCl
- Lysispuffer (Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,02%, SSC-Puffer 1x in dH₂O)
- SSC-Puffer: saline sodium citrate, 20x 1l:
 - 88,2g Natriumcitratdihydrat
 - 175,2g NaCl 3M
 - pH 7 mit Citronensäure
- DAPI-Lösung 2µg/ml

Die Proliferation wurde mit einem DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid) Test nachgewiesen. DAPI ist ein fluorochromer Farbstoff, der kovalent an A-T- Basenpaare der DNA bindet und bei einer Wellenlänge von 355nm angeregt werden kann. Anschließend wird das Licht bei einer Wellenlänge von 460nm emittiert.

Der Proliferationstest wurde in 96-Loch Platten angesetzt, in denen 6000 Zellen/Loch ausgesät und anschließend kultiviert wurden. Der Ansatz erfolgte in einer Vierfachbestimmung.

Für die Durchführung des Tests wurde das Medium abgekippt und die Zellen wurden zweimal mit NaCl gewaschen. Die Platten wurden abgeklopft, so dass das NaCl größtenteils abgeschüttelt wurde, danach wurden 100µl Lysispuffer/Loch auf die Zellen gegeben und für 15min auf einem Plattenschüttler inkubiert. Anschließend wurden je 100µl DAPI-Lösung hinzugefügt und für 5min inkubiert. Als Kontrolle (Leerwert) dienten vier Löcher ohne Zellen, welche identisch behandelt wurden.

Die Messung erfolgte an einem Fluoreszenzreader (FluoStar, BMG), wobei die Anregung von oben und die Messung von unten durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte über die FluoStar Software. Der Verstärkungswert (Gain) wurde konstant gewählt.

2.2.4. Induktionsansätze zur Differenzierung der Stammzellen in Epithelzellen

2.2.4.1. Zellkultivierung mit Wachstumsfaktoren

Lösungen:

- DMEM
- M199
- Glucose 100g/l

Zur Differenzierung der Zellen wurden diese unter der Zugabe von verschiedenen löslichen Faktoren zu DMEM Medium mit 2 oder 10% FKS für 14 Tage kultiviert. Bei den verwendeten Faktoren handelte es sich um ATRA, Aktivin A (ActA), das Knochenmorphogenetische Protein 7 (BMP-7), den Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF), den sauren Fibroblasten Wachstumsfaktor (aFGF), bFGF, EGF, den Keratinozyten Wachstumsfaktor (KGF), IGF-2 und den vaskulären endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF). Das Medium wurde alle drei bis fünf Tage gewechselt. Dabei wurden die folgenden Konzentrationen verwendet:

Tab. 2 Konzentration verwendeter Wachstumsfaktoren für Versuche mit ATRA, ActA und BMP-7

Wachstumsfaktor	Stammkonzentration	Konzentration mittel	Konzentration hoch	Konzentration niedrig
ATRA	10mM	5µM	10µM	2,5µM
ActA	10µg/ml	10ng/ml	20ng/ml	5ng/ml
BMP-7	1mg/ml	50ng/ml	100ng/ml	25ng/ml

Tab. 3 Konzentration verwendeter Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktor	Stammkonzentration	Endkonzentration
HGF	100µg/ml	10ng/ml
aFGF	10ng/ml	10ng/ml
bFGF	10µg/ml	10ng/ml
EGF	5µg/ml	20ng/ml
KGF	100µg/ml	10ng/ml
IGF-2	100µg/ml	60ng/ml
VEGF	100µg/ml	50ng/ml
ATRA	10mM	5µM

Außerdem wurde durch konditioniertes Medium (kM) gewonnen, indem Tubuluszellen für vier Tage mit Medium 199 kultiviert wurden und dieses Medium anschließend gesammelt wurde. Zusätzlich wurde Glucose zugesetzt, sodass die Konzentration 1g/l betrug.

2.2.4.2. Kultur auf einer extrazellulären Matrix

2.2.4.2.1. Gewinnung einer extrazellulären Matrix aus Tubuluszellen

Lösungen:

- 2,5% Dextranhaltiges Medium (Dextran T500, M199, 10% FKS)
- EDTA 2M, 10M
- Urea 2M
- Triton-x-100 0,05% (in PBS)
- NH₄OH 0,02M (in H₂O)
- Triton-x-100 0,05% und NH₄OH 0,02M (in PBS)
- NaCl

- Coomassie-Blau-Färbelösung 0,2% (0,2g Coomasie, 30ml Methanol, 10ml Essigsäure, aufgefüllt mit dH₂O auf 100ml)

Tubuluszellen bilden in Zellkulturen eine extrazelluläre Matrix aus, die auf einer Plastik als Beschichtung bestehen bleiben kann. Zuerst wurden die Tubuluszellen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert, anschließend wurden die Zellen noch für vier weitere Tage mit 2,5% Dextran als Medienzusatz weiterkultiviert, um die Zelldichte zu erhöhen. Für die Ablösung der Zellen wurde untersucht, welche Lösung die Zellen löst, ohne die Matrix zu zerstören. In Frage kamen EDTA 2M und 10M, 2M Urea, 0,05% Triton-x-100 in PBS, 0,02M NH₄OH in H₂O sowie eine Kombination von Triton-x-100 und NH₄OH in derselben Konzentration in PBS.

Die Inkubationszeit bei der Verwendung von EDTA betrug mehrere Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ oder mehr als 12h über Nacht im Kühlschrank bei 4°C, um einen Teil der Zellen zu lösen, während die Inkubationszeit bei den anderen Lösungen nur 15 Minuten betrug. Für die vergleichenden Versuche wurde die Inkubationszeit standardmäßig auf 15 Minuten festgesetzt.

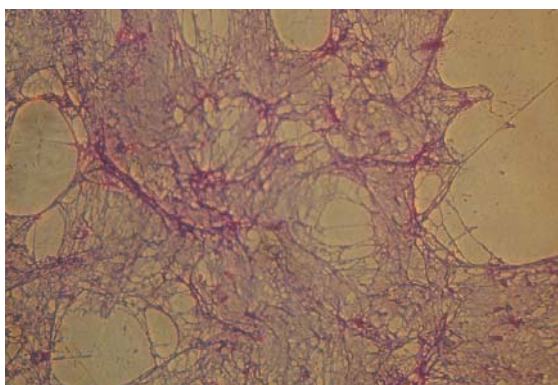


Abb. 9 Färbung der extrazellulären Matrix von Tubuluszellen mit Coomassie Blue. Das verwendete Mittel zur Ablösung der Zellen war Triton-x-100/ NH₄OH in PBS.

Der Nachweis von nicht gelösten, lebenden Tubuluszellen und von extrazellulärer Matrix wurde über eine Färbung mit Coomassie Blau vorgenommen. Im Zusammenhang mit der extrazellulären Matrix wurden auch verschiedene Wachstumszusätze getestet, da ein Zusammenspiel verschiedener Parameter für die Differenzierung von Zellen am wahrscheinlichsten ist und es den Bedingungen *in vivo* am Nächsten kommt.

Für alle folgenden Versuche mit extrazellulärer Matrix aus Tubuluszellen wurde 0,5% Triton-x-100 und NH₄OH in PBS verwendet, da keine lebendigen Zellen mehr auf der Zellkultur-Plastik zu erkennen waren, dafür aber ein Netz von Matrix-Filamenten. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 15 Minuten im Brutschrank. Danach wurden die Zellen zweimal mit NaCl gewaschen.

2.2.4.2.2. Versuche mit Matrigel

Lösungen:

- Matrigel
- Collagen IV
- DMEM Medium
- FKS
- Konditioniertes Medium
- Glucose 100g/l
- Matrigel Recovery solution

Zunächst wurde der Einfluss von Matrigel und den Beschichtung mit Collagen IV auf die Proliferation der Zellen untersucht. Dafür wurde ein Proliferationsassay mit DAPI nach ein, zwei, und vier Tagen durchgeführt. Die Zusammensetzung von Matrigel entspricht mit Laminin, Collagen IV und Entactin der einer typischen Basalmembran. Matrigel enthält zusätzlich noch einige Wachstumsfaktoren. Matrigel geliert bei Raumtemperatur und bildet einen natürlichen Untergrund für die Zellkultur.

Tab. 4 Zusammensetzung von Matrigel

Durchschnittliche Menge an Wachstumsfaktoren in Matrigel	
Parameter	Matrigel Matrix
bFGF (pg/ml)	0 - 0.1
EGF (ng/ml)	0.5 - 1.3
IGF-1 (ng/ml)	15.6
PDGF (pg/ml)	12
NGF (ng/ml)	< 0.2
TGF-beta (ng/ml)	2.3
Zusammensetzung der ECM in Matrigel	
Matrigel Komponenten	Prozent in Matrigel Matrix
Laminin	56%
Collagen IV	31%
Entactin	8%

Die Untersuchung mit Matrigel umfasst drei verschiedene Ansätze für die Differenzierung in Tubuluszellen:

Als Erstes wurde das Matrigel pur verwendet, wobei in 24-Loch Platten 300µl Matrigel ausgebracht wurden, diese nach 1h Gelierzeit mit DMEM Medium + 2% FKS (DF 2%) versehen wurden und anschließend 50000 ASC ausgesät wurden. Für die Beschichtung mit Collagen IV wurde eine Konzentration von 25µg/ml gewählt. Das Collagen wurde auf die Plastik gegeben und ebenfalls für 60min inkubiert, anschließend wurden die Löcher zweimal mit NaCl gewaschen, bevor die ASC darauf kultiviert wurden. Es wurden 50000 Zellen/Loch in 24-Loch Platten und 80000 Zellen/Loch in 6-Loch Platten ausgesät. Nach fünf Tagen Kultur wurde die eine Hälfte der Versuche vom DMEM Medium auf konditioniertes Medium umgestellt. Das konditionierte Medium wurde aus Medium 199 ohne FKS gewonnen, das für vier Tage auf Tubuluszellen kultiviert wurde, um die durch die Nierenzellen freigesetzten Faktoren zu erhalten. Da der Glucosegehalt durch die vorangehende Kultur reduziert wurde, wurden dem Medium außerdem 1g/l Glucose zugesetzt. Zusätzlich wurden immer unbeschichtete Kontrollen mitgeführt. Die gesamte Kulturzeit für diese Versuche betrug 14 Tage. Danach wurden Fotos zur Dokumentation der Zellmorphologie gemacht und Proben in Ripa-Puffer für Western Blots genommen. Da bei den Versuchen mit purem Matrigel die Zellen nicht abgekratzt werden konnten, wurden die Proben zuerst mit einer Matrigel Recovery Solution versetzt, durch welche das Matrigel zersetzt wurde, ohne die Zellen zu schädigen. Nach 1h Inkubation unter Schütteln auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet wurde in Ripa-Puffer aufgenommen. Die Proteinbestimmung erfolgt mittels Lowry-Test.

Als Zweites wurde das Matrigel als Medienzusatz verwendet, indem es 1:66,6 in DMEM Medium verdünnt wurde, was eine Konzentration von 145,6µg/ml ergab. Ebenfalls verdünnt wurde das Collagen IV, das in einer Konzentration von 3µg/ml in das Medium gegeben wurde. Die Kultur erfolgte insgesamt für 14 Tage und wurde nach fünf Tagen teilweise auf konditioniertes Medium umgestellt, welches in gleicher Weise mit den beiden Zusätzen versetzt wurde. Bei der Verwendung von Matrigel als Medienzusatz in den 6-Loch Platten wurde Ripa-Puffer auf die Zellen gegeben und dieses mit Zellschabern vom Boden abgekratzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

Als Drittes wurde eine Beschichtung mit verdünntem Matrigel durchgeführt. Das Matrigel wurde dabei auf 500µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml und 50µg/ml in kaltem DMEM Medium verdünnt. Die Kulturgefäße wurden für eine Stunde bei RT inkubiert, die ungebundenen Reste abgesaugt und anschließend mit serumfreien Medium zweimal gewaschen.

2.2.4.3 Co-Kultur von ASC und TEC

2.2.4.3.1. Indirekte Co-Kultur mit Membraneinsätzen

Lösungen:

- NaCl oder PBS
- Trypsin/EDTA
- Kulturmedium (2% FKS, Pen/Strep 1:250)

Die Zellen wurden zweimal mit PBS oder NaCl gewaschen und mit Trypsin bei 37°C von ihrem Untergrund gelöst. Sie wurden in Medium mit 10% FKS aufgenommen. Dabei wurde für die mesenchymalen Stammzellen DMEM Medium und für die

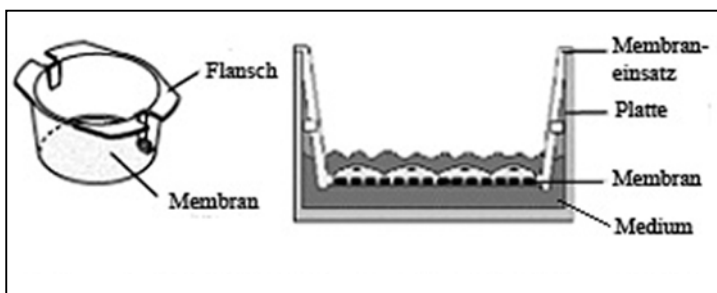


Abb. 10 Darstellung von BD Falcon Cell Culture Inserts; Quelle BD Biosciences

distalen und proximalen Tubuluszellen Medium 199 verwendet. Für die Co-Kultur wurde DF 10% verwendet. Es wurden 50000 ASC/Loch in 6-Loch Platten oder 20000 ASC/Loch bei der Verwendung von 24-Loch Platten ausgesät. Anschließend wurden die Membraneinsätze mit Hilfe einer Pinzette in die Löcher gehängt und mit Tubuluszellen besetzt. Die Porengröße der verwendeten Membraneinsätze betrug 3µm. Die Zellen wurden mit 4 respektive 2ml DMEM Medium versorgt und dann im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle drei bis fünf

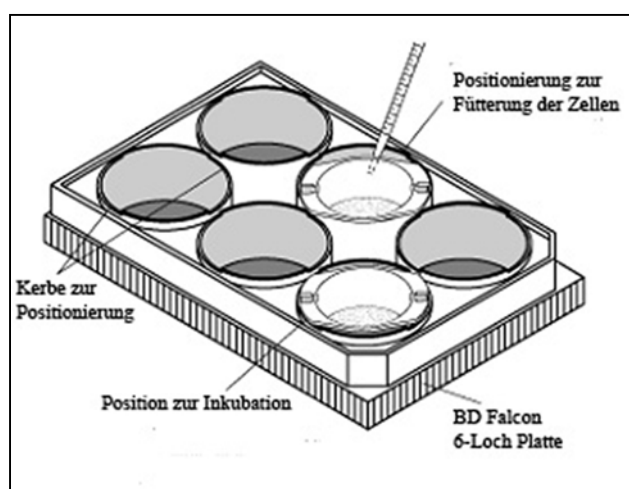


Abb. 11 Darstellung von BD Falcon Cell Culture Inserts

Tage wurde das Medium gewechselt. Über den gesamten Zeitraum des Versuches wurden Fotos zur Dokumentation gemacht.

Für die Versuche wurden zum einen Tubuluszellen und zum anderen Gewebestücke von der Niere verwendet. Für die Experimente mit den Gewebestücken wurde DF 2% und Pen/Strep verwendet. Die ASC wurden nach dem Lösen mit Trypsin mittels einer

Neubauerkammer gezählt; ausgesät wurden dann 100000 Zellen pro Loch. In die Membraneinsätze wurden bis zu 200000 Tubuluszellen oder klein geschnittenes Nierengewebe gegeben.

Nach sieben Tagen Kultur wurde bei der Hälfte der Experimente EGF mit einer Endkonzentration von 20ng/ml hinzugefügt.

2.2.4.3.2 Direkte Co-Kultur

Markierung mit CellTracker

Lösungen:

- Kulturmedium
- CellTracker green CMFDA (25µM in DMEM)

Die Zellen wurden in der gewünschten Konzentration in Kulturflaschen, 6-Loch Platten oder Chamber Slides ausgesät. Nachdem sich die Zellen über Nacht absetzen konnten, wurden sie am nächsten Tag zweimal gut mit PBS gewaschen, um Rückstände von FKS zu entfernen. Es wurde eine 25µM-Lösung von CellTracker green CMFDA in serumfreien DMEM Medium angesetzt. Diese Lösung wurde nun auf die zu markierenden Zellen gegeben und für 1h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung abgenommen und DF 10% wurde auf die Zellen gegeben. Dieser Schritt diente der Entfernung des nicht in den Zellen aufgenommenen CellTrackers. Die Zellen wurden für mind. 30 min im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert bevor sie erneut mit DF 10% gewaschen wurden.

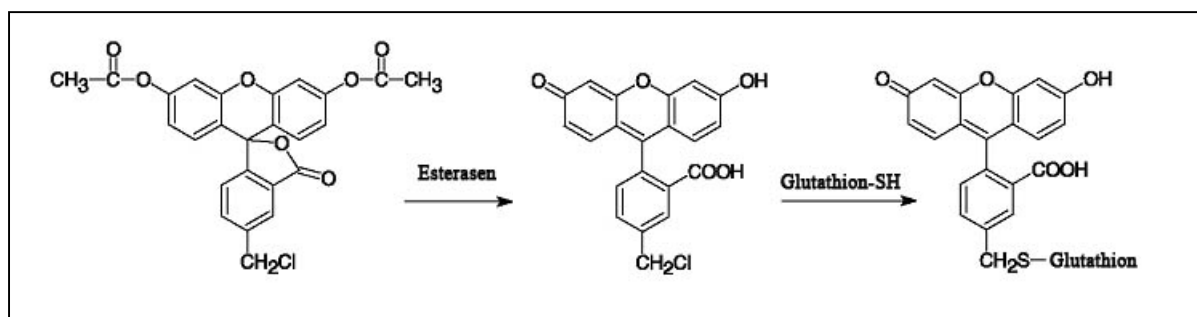


Abb. 12 CellTracker CMFDA Reaktion; die Abbildung zeigt die interzelluläre Reaktion des CellTrackers. In der Zelle wird das farblose CMFDA durch Esterasen gespalten und erhält so die fluoreszierende Form. Die Reaktion mit Glutathion, hier als zweites dargestellt, kann auch zuerst stattfinden. Nach der chemischen Reaktion kann der CellTracker nicht mehr aus der Zelle hinaus gelangen.

Anschließend wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben. Die Kultivierung fand bei 37°C mit 5% CO₂ im Brutschrank statt.

2.2.5. Immunologische Methoden

2.2.5.1. Immunfluoreszenztest

Lösungen:

- PBS
- Aceton/Ethanol 1:2
- Blocklösung (α -Globulin 1:10, Ziegen Serum 5% in PBS)
- Kaisers Glyceringelatine (Eindeckelmedium)

Für den Immunfluoreszenztest (IFT) wurden die Zellen auf Chamber Slides mit 8 Kammern und einer Fläche von 0,96cm² ausgesät und bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert.

Der IFT konnte unsteril durchgeführt werden. Dafür wurde zunächst das Medium abgekippt und anschließend dreimal mit 200µl PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 100µl Aceton/Ethanol 1:2 für 10min bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 100µl einer Blocklösung bestehend aus α -Globulin (1:10) und Ziegen Serum (1:20) in PBS auf die Zellen gegeben, und bei RT für 20min inkubiert. Zwischen den folgenden Färbeschritten wurden die Zellen jeweils dreimal mit PBS gewaschen.

Der erste Antikörper wurde in einer 1:10 verdünnten Blocklösung auf die Zellen gegeben, wobei die Konzentration je nach Antikörper unterschiedlich war. Als Primärantikörper wurden Desmin (30µg/ml), Zytokeratin 18 (CK18) (1-2µg/ml), pan Zytokeratin (panCK) (1,64µg/ml), panCK- Fluorescein Isothiocyanat (FITC) (14µg/ml), glattmuskuläres Aktin (smA) (2,3µg/ml) und Zona Occludens Protein 1 (ZO-1) (5µg/ml) verwendet.

Es wurden 100µl der Antikörperlösung pro Kammer verwendet, so dass der Boden und damit die Zellen vollständig bedeckt waren. Die Inkubationszeit für den Erstantikörper betrug 45min und wurde bei 37°C unter Schütteln durchgeführt. Der Zweitantikörper (goat-anti-mouse-Cy3 (rot) oder -FITC (grün)) wurde nach dem Waschen für 45min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Konzentration des Zweitantikörpers betrug 2µg/ml bei dem Cy3 Antikörper bzw. 15µg/ml bei dem FITC Antikörper. Da der Desmin Antikörper aus Hasen stammte, wurde ein FITC-a-rabbit Antikörper zur Färbung verwendet. Zusätzlich zu dem Zweitantikörper wurde für die Färbung der Zellkerne DAPI hinzugefügt (blau), welches in

einer Endkonzentration von 1µg/ml eingesetzt wurde. Bei bereits gefärbten Antikörpern entfiel die Verwendung eines zweiten Antikörpers und die Inkubation wurde mit DAPI alleine durchgeführt. Anschließend wurden die Proben gewaschen und mit Kaisers Glyceringelatine als Eindeckelmedium eingedeckelt.

Für eine Doppelfärbung mit zwei verschiedenen Erstantikörpern wurde das Protokoll für den einen Antikörper wie beschrieben durchgeführt. Nachdem der Zweitantikörper auf den Zellen aufgetragen war, erfolgte anstelle des Eindeckelns eine zweite Färbung mit Antikörpern. Danach begann die Färbung mit Erst- und Zweitantikörper wie zuvor beschrieben. Da die Erstantikörper aus verschiedenen Spezies stammten, sollte keine unspezifische Reaktion stattfinden. Der Zweitantikörper war jeweils gegen die Spezies gerichtet, aus der der erste Antikörper stammte. Die DAPI Färbung erfolgte separat nach der Färbung mit den Antikörpern für 10min bei 37°C unter Schütteln im Brutschrank. Die Verdünnung von DAPI erfolgte in der 1:10 verdünnten Blocklösung oder in PBS.

2.2.5.2. Western Blot

Lösungen:

- PBS
- Ripa-Puffer (Tris pH 7,4 10mM, NaCl 150mM, EDTA 10mM, Urea 1M, Triton-x-100 0,5%, Tween 20 0,1%, SDS 0,1%, PMSF 1mM, Benzamidin 4mM, N-Ethylmaleimide (NEM) 10mM)
- Trenngelpuffer (18,18% Tris, 0,4% SDS in dH₂O, pH 8,8)
- Sammelgelpuffer (6,06% Tris, 0,4% SDS in dH₂O, pH 7)
- Blocklösung (3% Magermilch, 0,1% Tween20 in TBS, oder 3% BSA, 0,1% Tween20 in TBS)
- Waschlösung (0,1% Magermilch, 0,1% Tween20 in TBS, oder 0,1% Tween20 in TBS)
- Laufpuffer (3,026% Tris, 1% SDS, 14,4% Glycin in dH₂O)
- Amoniumpersulfat (APS) 40%
- 3x SDS Puffer (Tris (pH 8,6) 62,5mM, Glycerin 30%, SDS 6%, β mercaptoethanol 6%, Bromphenolblau 0,01% in dH₂O, pH 6,8)
- TBS (0,5939% Tris, 0,875% NaCl in dH₂O, pH 7,4)
- Blotpuffer:

AI (36,6g Tris, 0,1g Na-azid, 200ml Methanol ad 1L dH₂O)

AlI (3,03g Tris, 0,1g Na-azid, 200ml Methanol ad 1L dH₂O)

K (5,2g 6Aminohexansäure, 0,1g SDS, 0,1g Na-acid ad 1L dH₂O)

- Coomassie (0,2g Coomassie, 30ml Methanol, 10ml Essigsäure, 60ml dH₂O)
- Entfärber (250ml Methanol, 50ml Essigsäure, 200ml dH₂O)
- Enhanced Chemiluminescence Lösung (ECL)
- Strippingsolution (2ml 10% SDS, 625µl 1M Tris pH 6,8 und 70µl β-Mercaptoethanol in 7,3ml dH₂O)

Für die Probenvorbereitung für das Western Blotting wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit Ripa-Puffer abgeschabt. Die Menge des Ripa-Puffers wurde nach der Größe der Kulturgefäße variiert; für 6-Loch Platten wurden 50-100µl verwendet. Die Zellen wurden in ein 1,5ml Röhrchen überführt und anschließend für 10min bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert, wonach die Proben entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren wurden. Die Ermittlung der Proteinmenge erfolgte über einen Lowry-Test.

Für die elektrophoretische Trennung wurde ein Polyacrylamidgel vorbereitet. Je niedriger das zu untersuchende Protein (in kDa) war, desto höherprozentig musste das Gel sein. APS sollte als letztes hinzugefügt werden, da das Gel danach schnell aushärtete.

Tab. 5 Zusammensetzung des Trenngels bei verschiedenen Konzentrationen des Polyacrylamids

	6%	7,5%	8%	10%
Polyacrylamid 30%	3ml	3,75ml	4ml	5ml
Trenngelpuffer	3,75ml	3,75ml	3,75ml	3,75ml
dH₂O	8,25ml	7,5ml	7,25ml	6,25ml
TEMED	25µl	25µl	25µl	25µl
APS 40%	14µl	14µl	14µl	14µl

Tab. 6 Zusammensetzung des Sammelgels

Polyacrylamid 30%	1ml
Sammelgelpuffer	1,875ml
dH₂O	4,75ml
TEMED	24µl
APS 40%	12,5µl

Das Trenngel wurde bei 50°C für 30-45min aushärten gelassen, ohne dass es dabei austrocknete. Über das Trenngel wurde anschließend das Sammelgel pipettiert und mit Kämme für die Taschen zur Polymerisation für 15-30min bei RT inkubiert.

Für die Proben wurde ausgehend von der zuvor bestimmten Proteinmenge ein Ansatz vorbereitet. Die Proben wurden mit dH₂O auf ein Endvolumen von 40µl aufgefüllt und es wurden 20µl 3x SDS Puffer hinzugefügt, so dass ein

Endvolumen von 60µl entstand. Die Proben wurden im Heizblock bei 95°C inkubiert und anschließend für 10min auf Eis gekühlt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingehängt. Der Laufpuffer wurde in die Kammer gefüllt und das Gel konnte beladen werden. Dazu wurden die Proben mit einer Hamilton-Spritze in die einzelnen Taschen gefüllt, zusätzlich wurde ein Marker zur Bestimmung der Bandenhöhe mitlaufen gelassen. In der Elektrophoresekammer wurde das Gel zuerst für 15min bei 100V und 40mA, d.h. 20mA pro Gel, dann für ca. 1h bei 110V und 6mA bzw. 30mA pro Gel laufen gelassen. Zum Blotten wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde zuerst für 10min in Methanol gebadet, danach für 5min in Wasser geschüttelt und abschließend für 5-10min in AII-Puffer gelegt. Das Blotpapier wurde so zugeschnitten, dass es nicht viel größer als die Membran war. Die Anode wurde mit Wasser befeuchtet und das Blotpapier wurde in AI-Puffer getränkt und auf die Anode gelegt. Ein weiteres Blotpapier wurde in AII-Puffer getränkt und auf das AI-Blotpapier gelegt, auf welche die Membran folgte. Der Laufpuffer aus der Kammer wurde weggekippt und die Glasplatten wurden herausgenommen. Das Sammelgel wurde mit einer Pinzette vom Trenngel getrennt und auf die PVDF-Membran gelegt und ein weiteres mit K-Puffer getränktes Blotpapier auf das Gel geschichtet, ohne dass

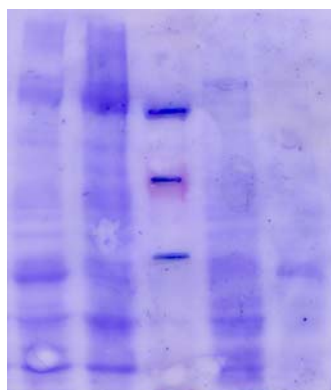


Abb. 13 Beispiel für die Anfärbung der Banden mit Coomassie Blau

Luftblasen entstanden. Die Kathode wurde nun ebenfalls mit dH₂O befeuchtet und die Apparatur wurde geschlossen. Das Gel wurde für 1h bei 15V und 110mA, d.h. 55mA pro Gel, behandelt. Danach wurden die Kathode, das Blotpapier und das Gel vorsichtig entfernt. Die Membran wurde mit Datum und Versuch beschriftet und der Marker nachgemalt. Anschließend wurde die Membran in einem Coomassie-Bad gefärbt und mit einer Entfärbelösung aus Methanol, Essigsäure und dH₂O entfärbt, bis Banden sichtbar wurden und die Membran selbst fast farblos war. In einer Blocklösung wurde bei 4°C über Nacht oder 2h bei RT geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Der nächste

Schritt bestand im Waschen der Membranen für ca. 5min in einer Waschlösung. Dazu wurden die Membranen in 50ml Röhrchen gelegt und rotiert, so dass sie nicht austrockneten. Der Primärantikörper wurde in der Waschlösung in einem 50ml-Röhrchen verdünnt, so dass ein Endvolumen von 3ml entstand. Die Membran wurde zu dem Primärantikörper gegeben und für 1,5h bei RT oder über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden Spezies-spezifische Antikörper, die mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert

waren, verwendet. Zur Detektion auf einem Film wurde Enhanced Chemilumineszenz-Lösung (ECL-Lösung), ein luminol-basiertes Substrat für HRP-katalysierte Detektion, benutzt.

Für die Analyse von weiteren Antikörpern wurden die Blots mit einer Strip-Lösung gestrippt. Die Membranen wurden bei 50°C für 30min unter Schütteln inkubiert, um die Antikörper von den Blots zu lösen. Anschließend wurden die Membranen mit Waschlösung sowie TBS für je 30 weitere Minuten gewaschen. Die Blots werden für 1h mit der Blocklösung inkubiert und wie oben beschrieben mit dem Primärantikörper weitergeführt.

2.2.5.3. Lowry-Test zur Proteinbestimmung

Lösungen:

- Reagenz S
- Reagenz A
- Reagenz B
- Ripa-Puffer
- 1% BSA

Zuerst wurde ein Reagenzgemisch aus 20µl Reagenz S und 1ml Reagenz A hergestellt. Als Standard wurde 1% BSA verwendet. Es wird eine Standardreihe ausgehend von den beiden oberen Konzentrationen hergestellt, wobei die Verdünnung in dem selben Puffer, in dem die Proben aufgenommen wurden, durchgeführt wurde (3000µg/ml, 2000µg/ml, 1500µg/ml, 1000µg/ml, 750µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, Leerwert nur mit Probenpuffer). Pro Loch der 96-Loch Platte wurden 5µl Probe, 25µl Reagenzgemisch und 200µl Reagenz B zusammengegeben, wobei Doppelbestimmungen von allen Proben gemacht wurden. Die Proben wurden kurz gemischt und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte bei 650nm gemessen.

2.2.5.4. Durchflusszytometrie

Lösungen:

- PBS
- α -Globulin 1:1000 in PBS
- Saponinpuffer 0,03%
- PFA 1%

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Die gelösten Zellen wurden in PBS aufgenommen, auf FACS-Röhrchen verteilt und bei $350\times g$ für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in einer Blocklösung mit α -Globulin 1:1000 in PBS aufgenommen, in der die Zellen für 5min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurde die Blocklösung bei $350\times g$ für 5min abzentrifugiert. Da die Zellzahl oft gering war, sollte der Überstand vorsichtig abpipettiert werden und nicht abgekippt, um den Zellverlust zu dezimieren. Bei einem deutlichen Pellet konnte der Überstand auch abgekippt werden. Der erste Antikörper wurde je nach Antikörper in unterschiedlicher Konzentration auf die Zellen gegeben, die Proben wurden gevortext, bis sich das Pellet vollständig gelöst hatte und anschließend für 15min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 2ml PBS gewaschen und bei $350\times g$ für 5min zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurde der Zweitantikörper zur Fluoreszenzmarkierung auf das Pellet gegeben und dieses gelöst. War der Erstantikörper direkt gelabelt, entfiel dieser Schritt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 20min im Dunkeln bei 4°C . Die Zellen wurden erneut mit 2ml PBS gewaschen und bei $350\times g$ für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in $200\mu\text{l}$ 1% PFA fixiert. Die FACS Analyse konnte gleich anschließend oder zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden, wenn die Proben bei 4°C zugedeckt gelagert wurden.

Tab. 7 Primär- und Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Markierung	Menge
CD10	PE	$5\mu\text{l}$
CD13	FITC	$5\mu\text{l}$
CD 26	PE	$10\mu\text{l}$
CD29	FITC	$5\mu\text{l}$
CD44	FITC	$5\mu\text{l}$
CD49a	Ungelabelt	$2\mu\text{l}$
CD73	Ungelabelt	$2\mu\text{l}$
CD90	Ungelabelt	$1\mu\text{l}$
CD105	FITC	$5\mu\text{l}$
CD166	PE	$10\mu\text{l}$
PE	Anti Maus IgG	$0,075\mu\text{g}$ pro Ansatz
FITC	Anti Maus	$15\mu\text{g/ml}$

2.2.5.5. HGF-ELISA

Lösungen:

- Kulturmedium
- Waschpuffer (0,05% Tween20 in PBS, pH 7,2 - 7,4)
- Human HGF DuoSet :
 - Capture Antibody (Maus anti-human HGF Antikörper zur Erfassung des HGFs)
 - Detection Antibody (biotinylierter Ziege anti-human Antikörper zur Detektion)
 - Standard (rekombinantes humanes HGF)
 - Streptavidin-HRP
- PBS
- 1% BSA Lösung (in PBS, pH 7,2 - 7,4)
- Substratlösung: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)
- Stopplösung: 1N HCL

Für den Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF)-ELISA wurden die ASC in 12-Loch Platten mit 300µl DMEM Medium mit 10% FKS und verschiedenen Wachstumsfaktoren kultiviert. Nach zwei bzw. vier Tagen wurden Proben entnommen, indem das Medium aus den einzelnen Löchern vollständig in Eppendorfröhrchen überführt wurde. Die Proben wurden bei 13000rpm für 10min zentrifugiert, um Zelldebris und Rückstände zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Röhrchen transferiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Durchführung des HGF-Assays bei -20°C. Am ersten Tag des HGF-Assays wurden die ELISA Platten mit einem Capture Antibody beschichtet. Dafür wurde der Capture Antibody zuerst von einer Stammkonzentration von 360µg/ml auf eine Endkonzentration von 1µg/ml mit PBS verdünnt und anschließend in die Löcher gegeben. Pro Loch wurden 100µl der Lösung verwendet und bei RT über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Löcher zunächst dreimal mit 400µl eines Waschpuffers gewaschen, der aus 0,05% Tween20 in PBS bestand und auf einen pH-Wert zwischen pH 7,2 - 7,4 eingestellt wurde. Nach dem Waschen wurden 300µl einer 1%igen BSA Lösung in PBS, die ebenfalls einen pH-Wert zwischen pH 7,2 – 7,4 hatte, in die Löcher gegeben. Mit dieser Lösung wurde die Platte für mindestens 1h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Löcher wieder wie zuvor gewaschen. Danach wurden jeweils 100µl der Proben sowie eine Standardreihe aufgetragen. Die Standardreihe wurde ausgehend von einer Stammkonzentration von 420ng/ml auf 4000pg/ml verdünnt und von dort in einer 1:2 Verdünnung weitergeführt.

Es folgte eine zweistündige Inkubation bei RT, nach der die Löcher erneut gewaschen wurden. 100µl des Detection Antibodys mit einer Konzentration von 200ng/ml wurden in die Löcher gegeben, für 2h bei RT inkubiert und anschließend gewaschen. 100µl Streptavidin-HRP (1:200 verdünnt) wurden in die Löcher gegeben und für 20min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde die Platte zugedeckt, sodass kein direktes Licht hineinscheinen konnte. Nach dem Waschen wurde 100µl der Substratlösung 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) pro Well ausgebracht, die ebenfalls für 20min bei RT ohne Lichteinstrahlung inkubiert wurde. Abschließend wurden 50µl 1N HCL, welches als Stopplösung fungierte, hinzugefügt und der ELISA wurde bei 450nm im ELISA Reader gemessen. Es wurden die folgenden Wachstumsfaktoren verwendet:

Tab. 8 Konzentration der Wachstumsfaktoren und Zytokine für den HGF- ELISA

	Zusätze	Endkonzentration		Zusätze	Endkonzentration
1	Control DF		12	Cytomix 2 TNF 1ng/ml IFN 20U/ml IL1b 2,5U/ml	1ng/ml 20U/ml 2,5U/ml
2	TNF 10 ng/ml	10ng/ml	13	Cytomix 3 TNF 0,1ng/ml IFN 2U/ml IL1b 0,25U/ml	0,1ng/ml 2U/ml 0,25U/ml
3	TNF 1 ng/ml	1ng/ml	14	EGF 100	100µg/ml
4	TNF 0,1 ng/ml	0,1ng/ml	15	EGF 10	10µg/ml
5	IFN 200 u/ml	200U/ml	16	EGF 1	1µg/ml
6	IFN 20 u/ml	20U/ml	17	EGF 0,1	0,1µg/ml
7	IFN 2 u/ml	2U/ml	18	bFGF	10ng/ml
8	IL1b 25 u/ml	25U/ml	19	VEGF	50ng/ml
9	IL1b 2,5 u/ml	2,5U/ml	20	Aktivin A	10ng/ml
10	IL1b 0,25 u/ml	0,25U/ml	21	LIF	20ng/ml
11	Cytomix 1 TNF 10ng/ml IFN 200U/ml IL1b 25U/ml	10ng/ml 200U/ml 25U/ml			

2.2.5.6. Fluoreszenz in situ Hybridisierung

2.2.5.6.1. Induktion der Metaphase

- Eisessig
- Colcemid
- Methanol
- Kaliumchlorid KCl
- Trypsin-EDTA
- Carnoy's Fixativ (3:1 Methanol- Eisessig)
- Hypotone Lösung 0,075M KCl
- Alkoholreihe
- 20xSSC Stocklösung
- 0,4 x SSC
- 2 x SSC und 0,05% Tween Lösung
- Methanol
- Nagellack

Die Zellen sollten zwischen 60-80% konfluent sein. Colcemid wurde in das Medium gegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,1µg/ml entstand. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 Minuten bis vier Stunden, wurde das Medium in einem 50ml Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden mit Trypsin gelöst, in Medium aufgenommen und zu dem anderen Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 300×g für 5min zentrifugiert und das Pellet wurde in 500µl Restmedium aufgenommen. Dann wurden die Zellen in 10ml Kaliumchlorid langsam aufgenommen und für 15min in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurden 3-5 Tropfen der Fixierlösung hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellen wurden wie zuvor zentrifugiert und das resultierende Pellet wurde in der Restflüssigkeit aufgenommen bevor 10ml der Fixierlösung hinzugegeben wurden. Die Zellen wurden zentrifugiert und der letzte Schritt wiederholt. Für die Lagerung wurden die Zellen in der Fixierlösung aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Für die Verwendung der Zellen wurden diese zweimal mit der Fixierlösung gewaschen bevor sie auf einen Objektträger aufgetropft und für mindestens 2 Stunden bei 60°C oder bei RT über Nacht trocknen gelassen wurden. Es wurden 50–100µl Zellsuspension aufgetropft.

2.2.5.6.2. *Cytocell Kit*

Der Objektträger wurde für 2min in 2xSSC eingelegt und anschließend in einer Alkoholreihe (70%, 85%, 100%) entwässert. Während die Objektträger trockneten, wurde die Sonde auf Zimmertemperatur erwärmt. 10µl der Sonde wurden auf den Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit Nagellack versiegelt. Der Objektträger wurde zur Denaturierung für 2min auf eine 75°C warme Heiplatte gelegt. Das Deckgläschen wurde entfernt und der Objektträger wurde für 2min in 0,4xSSC bei 72°C und anschließend für 30sec in 2xSSC und 0,05% Tween20 bei RT gewaschen. 10µl DAPI Antifade wurden vor dem Eindeckeln auf die Probe aufgetragen. Zur Farbentwicklung wurden die Proben 10min im Dunkeln gelagert.

2.2.6. Polymerase-Ketten Reaktion

2.2.6.1. RNA-Extraktion

Lösungen:

- NaCl
- Lösung D (4M Guanidinthiozyanat, Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser, 25mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 7, 0,5% N-Laurylsacrosin Natrium-Salz, β-Mercaptoethanol)
- 2M Natrium-acetat
- Chloroform-Isoamylalkohol 49:1
- Rotiphenol
- Isopropanol
- 70%/95% Ethanol
- DEPC Wasser

Die gesamte RNA-Extraktion erfolgte auf Eis und es wurde immer mit sterilen Materialien gearbeitet. Die adherenten Zellen wurden mit kaltem NaCl gewaschen und anschließend sofort auf Eis gestellt. Pro 75cm² Flasche oder 10cm-Schale wurden 1ml Lösung D auf die Zellen gegeben, die dann mit einem Schaber abgekratzt und in vorgekühlte 2ml Eppendorf-Röhrchen überführt wurden. Anschließend wurden die Zellen für 1h auf Eis inkubiert oder für eine spätere Weiterführung bei –20°C eingefroren.

Als nächstes wurden 50µl 2M Natriumacetat, 130µl Chloroform-Isoamylalkohol und 500µl Phenol in beliebiger Reihenfolge zu den Proben hinzugefügt und für ca. 15sec gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15min auf Eis wurden die Proben für 20min bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert. Es entstanden drei Phasen, von denen die oberste Phase die RNA enthielt und abgenommen wurde, ohne dass die milchige Phase in der Mitte, die Proteine enthielt, berührt wurde. Zu den Proben wurde die gleiche Menge an Isopropanol hinzugefügt. Nach dem Mischen folgte eine Inkubation bei -20°C, die für 1h oder über Nacht durchgeführt wurde. Danach wurden die Proben für 20min bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert. Es sollte ein Pellet sichtbar sein. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen. Falls sich das Pellet dabei von der Gefäßwand löste, wurde erneut für 15min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 95%igem Ethanol gewaschen und, falls notwendig, erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde nun luftgetrocknet und das getrocknete Pellet in DEPC Wasser resuspendiert. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

Um die RNA Menge zu ermitteln, wurde eine photometrische Messung vorgenommen. Dazu wurden in einer Quarzküvette 2µl der Probe in 750µl DEPC-Wasser gegeben und bei einer OD von 260nm und 280nm gemessen. Der Quotient von 260 und 280 gibt Auskunft über die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.2.6.2. cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Vor der PCR wurde die RNA in einer RT-Reaktion (Reverse Transkriptase) in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde ein Mix aus MgCl₂, 10xPCR Puffer, dNTPs und β-Mercaptoethanol angesetzt.

Für 1µg RNA wurden für die reverse Transkription

2µl MgCl₂ (50mM)- 5mM

2µl 10xPCR Puffer

1µl β-Mercaptoethanol

2µl dNTPs

und 0,25µl reverse Transkriptase eingesetzt.

Die Gesamtmenge der Proben betrug am Ende für drei Ansätze 20µl. Die Menge an dH₂O wurde auf die RNA-Menge abgestimmt. Die RNA wurde zusammen mit 1µl Random

Hexamer pro 1 µgRNA und dH₂O in ein PCR Tube gegeben und bei 70°C für 1min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und der Mix hinzugefügt. Die Proben wurden für 30min bei 37°C im Thermocycler inkubiert, danach auf 4°C abgekühlt und auf 75°C für 2min aufgeheizt, um das Enzym zu zerstören. Nach der Umschreibung in cDNA wurden die Proben entweder eingefroren oder direkt in der PCR weiterverwendet.

2.2.6.3. PCR

Lösungen:

- Agarosegel (0,9g Agarose in 60ml TAC Puffer)
- TAC Puffer (50× : 500mM Natriumacetat, 50mM EDTA, 2M Tris in dH₂O, pH 7,78 mit Essigsäure)
- GelRed (10000×)

Ein Master-Mix wurde hergestellt aus:

0,6µl MgCl₂
2,4µl 10xPCR Puffer
18,8µl dH₂O
0,2µl Taq Polymerase
2µl Primermix (sense und antisense)

Pro Ansatz wurden 24µl Master-Mix und 6µl Probe zusammengefügt. Die Proben wurden im Thermocycler nach der Aktivierung (5min bei 95°C) für 28-30 Zyklen mit jeweils 95°C (Denaturierung), 63°C (Annealing) und 72°C (Elongation) für je 1min laufen gelassen. Bei abschließenden 72°C für 4min wurde die Reaktion gestoppt. Die PCR-Proben wurden mit je 3,3µl Probenpuffer versetzt, für 10min auf 75°C erhitzt, für 10min bei 4°C gekühlt und auf ein 1,5% Agarosegel, aufgetragen. Zur Detektierung wurde GelRed 1:10000 verwendet. Zusätzlich wurde ein Standard mit auf das Gel gegeben. Die Gelkammer wurde angeschlossen und bei konstanten 70V laufen gelassen. Die Dauer der Laufzeit betrug ca. 45 - 90min.

2.2.6.4. qPCR

Die quantitative PCR erfolgte in 96-Loch Platten. Die Messung der Fluoreszenz wurde während jeden Schrittes in der Extensionsphase gemessen, wobei die Höhe der Fluoreszenz proportional zu der Menge des PCR-Produktes war.

Der Nachweis der Quantifizierung erfolgte über SybrGreen, einen Farbstoff, der sich zwischen doppelsträngige DNA-Moleküle legt und durch die Bindung ein Fluoreszenzsignal einer bestimmten Wellenlänge emittiert. SybrGreen hat sein Excitations- und sein Emissionsmaximum bei 494nm bzw. 521nm.

Es wurde ein Master-Mix aus SYBR-Green, RNase-freiem Wasser und Primermix hergestellt, was pro Ansatz 12,5µl SYBR-Green, 4,5µl Wasser und 2µl Primermix bedeutete. Pro Well ergab sich daraus 19µl Master-Mix, plus 6µl Probe, wodurch ein Endvolumen von 25µl entstand.

Die Auswertung erfolgte über die relative Quantifizierung in drei Schritten. Die C_T -Werte wurden gegen eine endogene Kontrolle normalisiert.

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ endogene Kontrolle}}$$

Anschließend wurde der $\Delta\Delta C_T$ Wert gebildet [Pfaffl, 2001], der der Normalisierung durch eine Kalibrationsprobe diene.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Probe}} - \Delta C_{T \text{ Kalibrator}}$$

Die Berechnung der relativen Expression (RQ) wurde durch die Formel

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

durchgeführt, wenn die Effizienz der verwendeten Primer in der PCR vergleichbar war. Die Effizienz wurde über eine Standardkurve ermittelt. Wichen die Effizienzen stark voneinander ab, musste die Formel angepasst werden.

2.2.7. Histologische Methoden

2.2.7.1. Paraffineinbettung für Schnitte

Lösungen:

- Ethanol 70%, 95%, 100%
- Xylol

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1%igem Paraformaldehyd (PFA) für 30min fixiert. Nach der Fixierung erfolgte eine Behandlung in einer Alkoholreihe:

2×10 min 70%, 2×10min 95%, 2×10min 100%, 10min in Xylol.

Danach wurden die Zellen auf 60°C erhitztes Paraffin gegossen. Die Proben härteten über Nacht bei Raumtemperatur aus und wurden anschließend für mindestens 24h bei –20°C gelagert. Schnitte wurden dann in einer Dicke von 5µm hergestellt. Sie wurden bei 50°C getrocknet und danach bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.7.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Lösungen:

- Ethanol 70%, 95%, 100%
- Xylol
- Hämalaun
- Eosinlösung 0,05%
- Eukitt (Eindeckellösung)

Die Objektträger mit den Schnitten wurden in ein Färbegestell mit Drahtbügel gestellt und so von einer Lösung in die andere überführt. Zuerst wurden die Zellen zweimal für 5min in Xylol getaucht, dann für 5min in 100%, 4min in 95% und 4min in 70% Ethanol. Die Objektträger wurden mit destilliertem Wasser abgespült und in einen mit Hämalaun gefüllten Coplin-Färbetrog überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurden die Proben unter fließendem Wasser für 10min gespült, bevor sie für 6-8min in eine 0,05%ige Eosinlösung getaucht wurden. Anschließend wurden die Proben erneut kurz mit destilliertem Wasser abgespült, um dann in umgekehrter Reihenfolge kurz in 70%, 2min in 95% und 5min in 100%

Ethanol getaucht zu werden. Nach zweimaliger 5min Inkubation in Xylol wurden die Proben mit Eukitt eingedeckelt. Die Kerne wurden bei dieser Färbung blau/violett gefärbt, während das Cytoplasma rosa dargestellt war.

2.2.8. Raster-Elektronenmikroskopie

Lösungen:

- Ethanol 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 95%, 100%, 100% reinst
- 2,5% Glutaraldehyd
- Hexamethyldisilazan (HMDS)

Die Proben wurden mit 2,5% Glutaraldehyd für 30min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 3-5min und am Ende in HMDS für 5min eingetaucht. Die Proben wurden in einem mit Silikagel bestückten Exikator platziert und ein Vakuum wurde hergestellt. Das Silikagel diente dem Entzug der restlichen Feuchtigkeit. Die Proben konnten für einige Zeit bei 4°C in dem Exikator gelagert werden.

Vor der Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop wurden die Proben mit Gold bedampft, was auch sputtern genannt wird. Die Analyse erfolgte im Hitachi S-4500 Raster-Elektronenmikroskop bei 5kV.

2.2.9. Statistische Auswertung

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) ermittelt. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der studentische t-Test für unpaarige Proben benutzt oder in Fällen, wo dieser nicht anwendbar war, der Mann-Whitney Rank Sum Test. Als statistisch signifikant wurden p -Werte $< 0,05$, als hoch signifikant p -Werte $< 0,01$ erachtet. Für die Auswertung wurden SigmaStat 2.03 und GraphPadPrism verwendet.

3. Ergebnisse

Für die Versuche wurden ASC aus dem Fettgewebe von 91 Donoren isoliert, wobei in 21 Fällen keine Angaben zu deren Alter, Größe oder Geschlecht vorhanden waren. Das durchschnittliche Alter der Spender betrug $44 \pm 12,99$, der durchschnittliche BMI $25 \pm 3,44$. Der größte Teil der Donoren war weiblich, nur 9,23% männlich.

3.1. Einfluss von chemischen Faktoren und Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung

3.1.1. Ergebnisse der Zellkultur mit Wachstumsfaktoren

Zuerst wurde die Proliferation von ASC bei der Verwendung unterschiedlicher Medienzusätze untersucht. Für den Versuch mit DAPI wurde das Kulturmedium DMEM plus 10% FKS (DF 10%) im Vergleich zu Medien mit einem Zusatz von sieben verschiedenen Wachstumsfaktoren und ATRA getestet. Der Test wurde dreimal wiederholt. Die verschiedenen Medien wurden getestet: (1) DMEM (DM), (2) DMEM + 2% FKS (DF 2%), (3) DF 10%, (4) DF 10% + ATRA (5 μ M), (5) DF 10% + bFGF (10ng/ml), (6) DF 10% + VEGF (50ng/ml), (7) DF 10% + bFGF (10ng/ml) + VEGF (50ng/ml), (8) DF 10% + aFGF (10ng/ml) + VEGF (50ng/ml) und (9) DF 10% + HGF (10ng/ml) + KGF (10ng/ml) + IGF-2 (60ng/ml) + EGF (20ng/ml) (WT-Mix). Mit diesen Medienzusätzen wurden außerdem Western Blot und qPCR Versuche durchgeführt. Da diese zusätzlich noch mit dem Einfluss der extrazellulären Matrix verglichen wurden, sind diese Ergebnisse Abschnitt 3.2.1 zugeordnet worden.

In dem Proliferationstest mit DAPI konnte gezeigt werden, dass ASC unterschiedlich auf die Wachstumsfaktoren reagieren. Als Standardmedium diente DF 10%. Für den Proliferationstest wurde die Kontrolle auf 100% gesetzt und alle anderen Medienzusammensetzungen darauf bezogen. Bei der Kultivierung mit serumfreien Medium war die Proliferation sehr gering bzw. die Zellzahl nahm sogar signifikant ab. Bei der Zugabe von 2% FKS war nach sechs Tagen Kultur ebenfalls eine hoch signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zum Standardkulturmedium zu erkennen. Das Kulturmedium mit 10% FKS zeigte eine gute Proliferation der Zellen, die jedoch bei Zugabe von ATRA geringer wurde. Nach Zugabe von bFGF proliferierten die Zellen am stärksten und nach sechs Tagen Kultur war eine signifikante Erhöhung der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle zu

erkennen. Wurde nur VEGF hinzugefügt, war die Proliferation der Zellen ähnlich zu der mit Kulturmedium, während ein Gemisch aus den Faktoren bFGF und VEGF ebenfalls eine gesteigerte Proliferation der Zellen hervorrief. Nach drei Tagen war die Veränderung bezüglich der Kontrolle bereits statistisch signifikant, nach sechs Tagen hoch signifikant. Die Faktoren aFGF und VEGF riefen eine geringe Proliferationssteigerung im Vergleich zum normalen Kulturmedium hervor. Die Mischung aus den vier verschiedenen Wachstumsfaktoren führte zu einer deutlichen Steigerung der Proliferation, die allerdings statistisch gesehen nicht signifikant war.

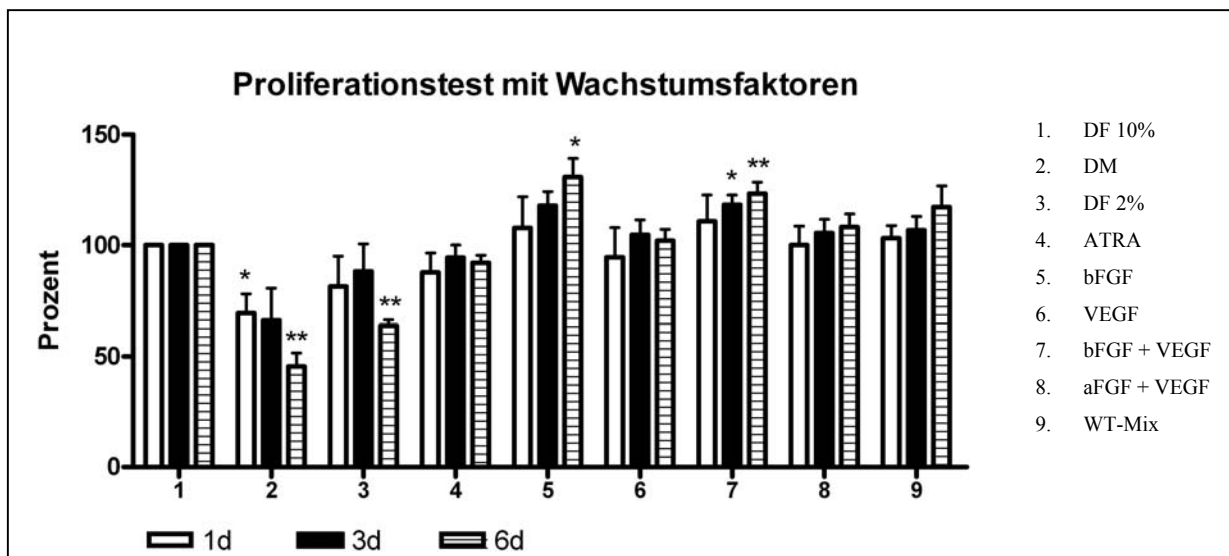


Abb. 14 Proliferationstest mit DAPI; Unterschiede in der Proliferation der ASC nach Zusatz von verschiedenen Faktoren zum Medium. Es wurden folgende Medien untersucht: ATRA, bFGF, VEGF, bFGF/VEGF, aFGF/VEGF und ein WT-Mix. Als Kontrolle wurde DMEM Medium mit 10% FKS verwendet, da die anderen Medien auf diesem basieren. Außerdem wurde ein serumfreies Medium und ein FKS reduziertes Medium (2%) getestet. Die Proben wurden nach einem, drei und sechs Tagen gemessen. ($n = 3$) (* = statistisch signifikant (p -Werte $< 0,05$); ** = statistisch hochsignifikant (p -Werte $< 0,01$)).

Da bFGF die stärkste Steigerung der Proliferation herbeigeführt hatte, wurde dieser Faktor zusätzlich in seiner Konzentrationsabhängigkeit untersucht. Es wurden 100ng/ml, 10ng/ml und 2ng/ml getestet, außerdem wurde die FKS Konzentration variiert. Als Kontrolle wurde DM verwendet und 2% und 10% FKS im Medium miteinander verglichen. Obwohl im Vergleich zum DM eine Steigerung der Proliferation mit allen untersuchten Medien ausgelöst wurde, war der Unterschied nicht signifikant.

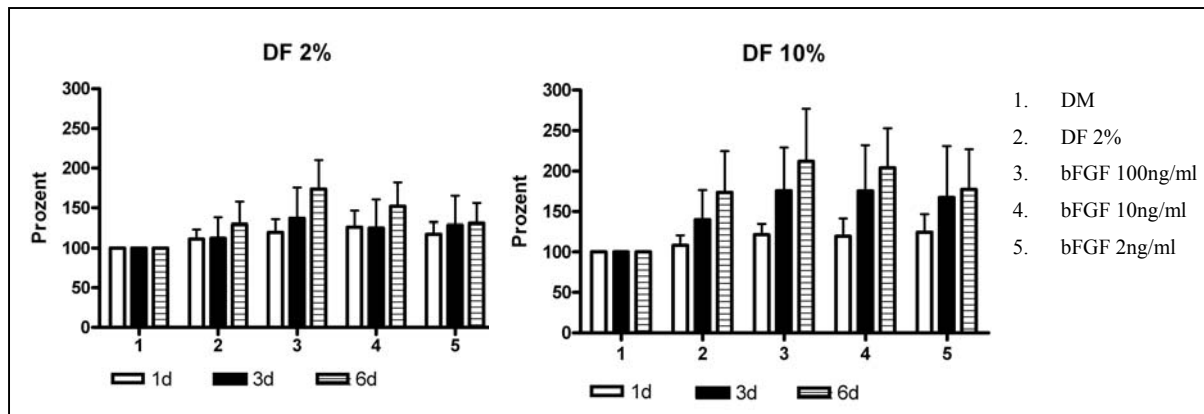


Abb. 15 Proliferationstest mit DAPI bei drei verschiedenen bFGF Konzentrationen; es wurden 100 ng/ml, 10 ng/ml und 2 ng/ml verwendet (n = 3).

Als letztes wurden Medien mit bFGF (100ng/ml, 10ng/ml) und VEGF (50ng/ml) mit den anderen Medien verglichen. Die höchste Proliferationsrate erreichte Medium mit 100ng/ml bFGF/VEGF, obwohl die Erhöhung nicht statistisch signifikant war. Die Standardabweichung war dabei sehr hoch.

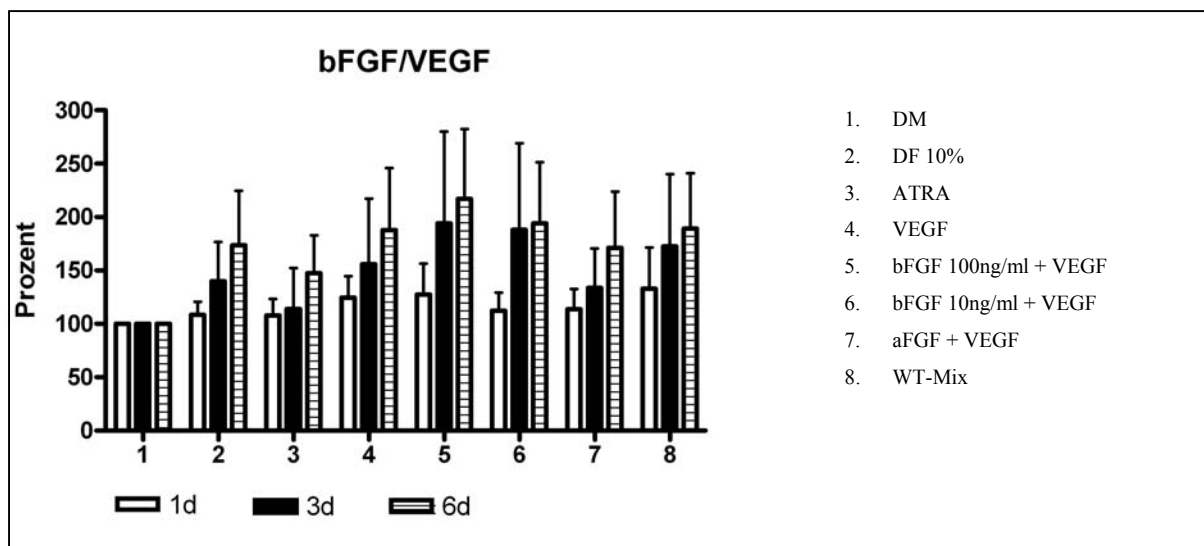


Abb. 16 Proliferationstest mit DAPI bei dem Zusatz von VEGF; Untersuchung verschiedener Medienzusätze abhängig von der Konzentration (n = 3).

Ein weiterer Abschnitt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Kombination der Faktoren ATRA, ActA und BMP-7. Die Versuche wurden mit DF 2% mit den jeweiligen Faktoren durchgeführt, weshalb DF 2% als Kontrolle verwendet wurde. Insgesamt wurden acht verschiedene Medien bezüglich ihres Einflusses auf die Proliferation getestet: DF10%, DF 2% + ATRA, DF 2% + ActA, DF 2% + BMP-7 und DF 2% + eine Mischung aus ATRA, ActA und BMP-7 in drei verschiedenen Konzentrationen (mittel: ATRA (5 μ M), ActA

(10ng/ml), BMP-7 (50ng/ml); niedrig: ATRA (2,5µM), ActA (5ng/ml), BMP-7 (25ng/ml); hoch: ATRA (10µM), ActA (20ng/ml), BMP-7 (100ng/ml)). Bei dem Proliferationstest mit DAPI wurden die Zellen für einen, drei und sechs Tage in 96-Loch Platten mit den jeweiligen Medien kultiviert. Die erhöhte Menge FKS führte nach sechs Tagen zu einer signifikant erhöhten Proliferation. Auch die Zugabe von EGF führte zu einer hochsignifikanten Proliferationssteigerung. Bei den anderen Medien zeigte sich eine verringerte oder unveränderte Proliferation. Die Verwendung von ATRA oder BMP-7 verringerte die Proliferation bereits nach drei Tagen hochsignifikant.

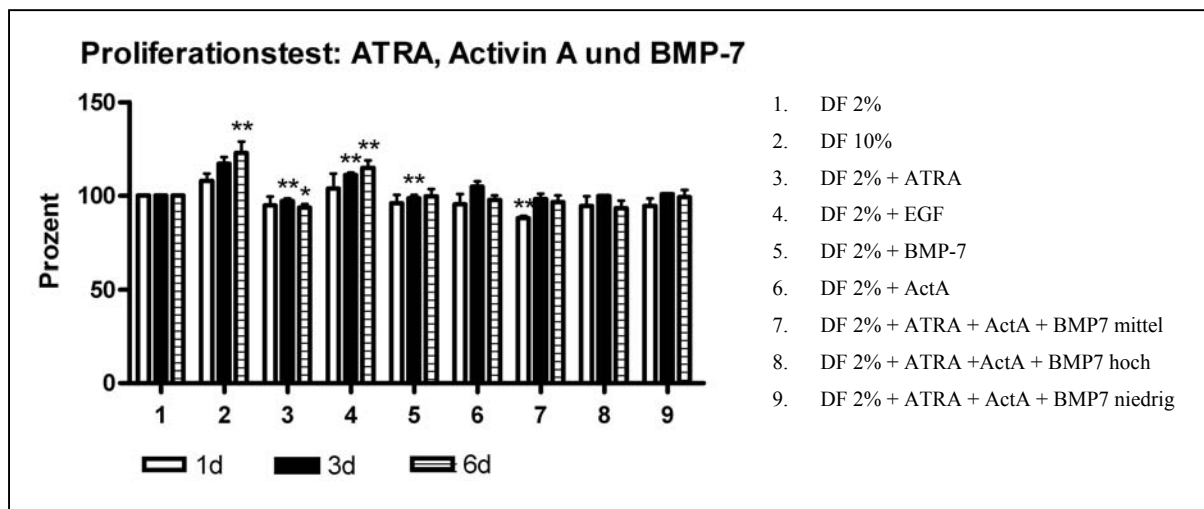


Abb. 17 Proliferationstest mit DAPI zur Untersuchung verschiedener Medien, die ATRA, ActA und BMP-7 enthielten; (n=5) (* = statistisch signifikant (p-Werte < 0,05); ** = statistisch hochsignifikant (p-Werte < 0,01).

Im Western Blot und in der qPCR wurden zusätzlich drei weitere Medienzusammensetzungen untersucht: 1. EGF, 2. EGF + ATRA und 3. konditioniertes Medium. Konditioniertes Medium bestand aus Medium 199, das durch die viertägige Kultur auf epithelialen Tubuluszellen konditioniert wurde, so dass sezernierte Faktoren im Medium enthalten waren. Außerdem wurden die Untersuchungen in konfluenten und subkonfluenten Stadium durchgeführt. Für die subkonfluenten Ansätze wurden die Zellen in einer bestimmten Zellzahl ausgesät, während die konfluenten Versuche bei Erreichen der Konfluenz begonnen wurden. Im Western Blot wurden CK18 und ZO-1 analysiert. In der qPCR wurden zusätzlich zu diesen beiden Genen noch Occludin (Occ), E-Cadherin (E-Cad), Aquaporin 1 (Aqp1) und wnt-4 untersucht. Ferner wurden CK18, panCK und ZO-1 in der Immunfluoreszenz getestet. Dabei wurden panCK und ZO-1 zusammen untersucht. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenzmikroskop und mittels konfokaler Mikroskopie.

Die Abbildung 18 zeigt einen Western Blot mit Aktin als Kontrolle und dem Nachweis der Regulation der CK18 Expression auf ASC durch verschiedene Medienzusätze. Die ASC, die in Kontrollmedium kultiviert wurden (1, Kontrolle) zeigten eine geringe CK18 Expression. Der Zusatz von ATRA erhöhte die CK18 Expression, ebenso wie die Zugabe von ATRA, ActA und BMP-7. Die Kombination von ATRA, ActA und BMP-7 erhöhte die CK18 Expression am stärksten.

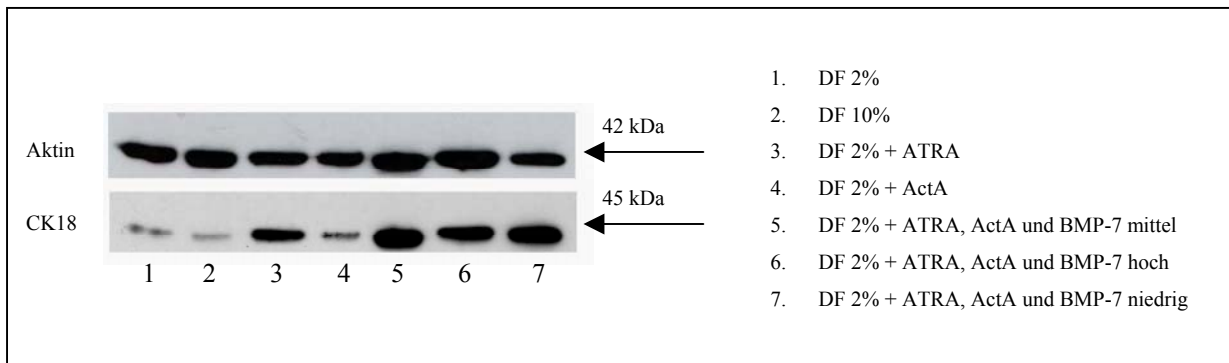


Abb. 18 Western Blot für den Zusatz von ATRA, ActA und BMP-7 zum Medium: Zytokeratin 18 Expression nach 14 Tagen Kultur

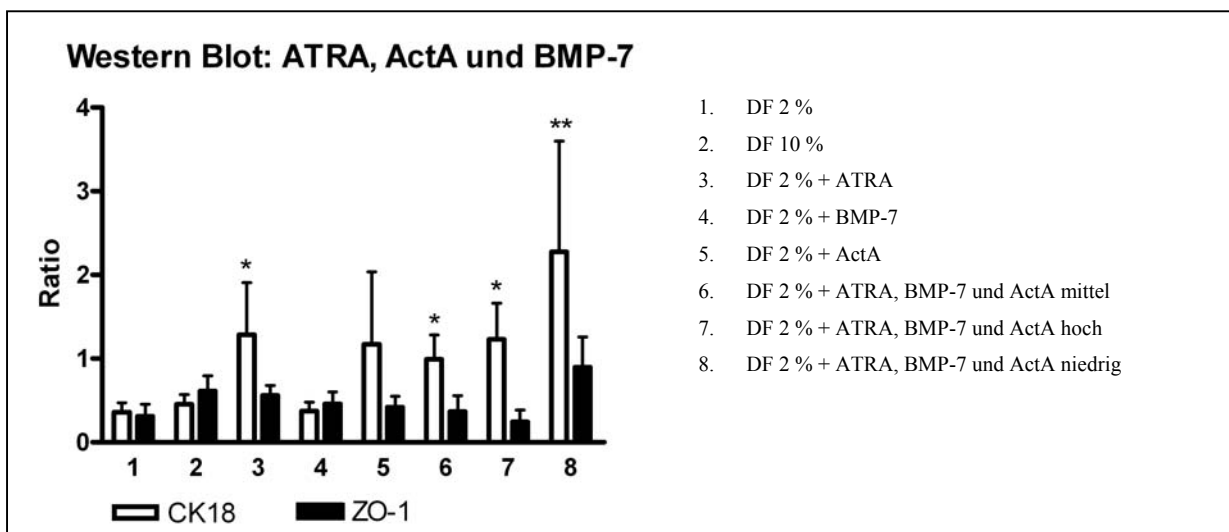


Abb. 19 Proteinexpression von CK18 und ZO-1 nach 14-tägiger Kultur mit ATRA, Aktivin A und BMP-7 (Western Blot, densitometrische Auswertung); die Abbildung zeigt acht verschiedene Medienzusammenstellungen basierend auf DMEM plus 2% FKS (n=7 für CK18; n=4 für ZO-1) (* = statistisch signifikant (p-Werte < 0,05); ** = statistisch hochsignifikant (p-Werte < 0,01)).

In der densitometrischen Auswertung der Western Blots mit ImageJ spiegelte sich dies in einer signifikanten Erhöhung der CK18 Expression nach der Induktion mit ATRA oder der Kombination von ATRA, ActA und BMP-7 wieder. Die niedrigste eingesetzte Konzentration

der Faktoren in der Kombination führte dabei zu der stärksten Steigerung der Expression. Eine Änderung der ZO-1 Expression konnte im Western Blot nicht gezeigt werden. Die erhöhte Expression bei der Kultivierung mit der niedrigsten Konzentration an ATRA, ActA und BMP-7 war statistisch nicht signifikant.

Bei den Versuchen mit konfluenten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von ATRA, ActA und BMP-7 im Gegensatz zu den einzelnen Komponenten die Expression der epithelialen Marker CK18 und ZO-1 erhöhte. Dabei schien die Konzentration nicht ausschlaggebend zu sein, da die Expression von CK18 hochsignifikant nur in der niedrigsten verwendeten Konzentration erhöht war, während ZO-1 in der mittleren und hohen Konzentration statistisch signifikant verändert war.

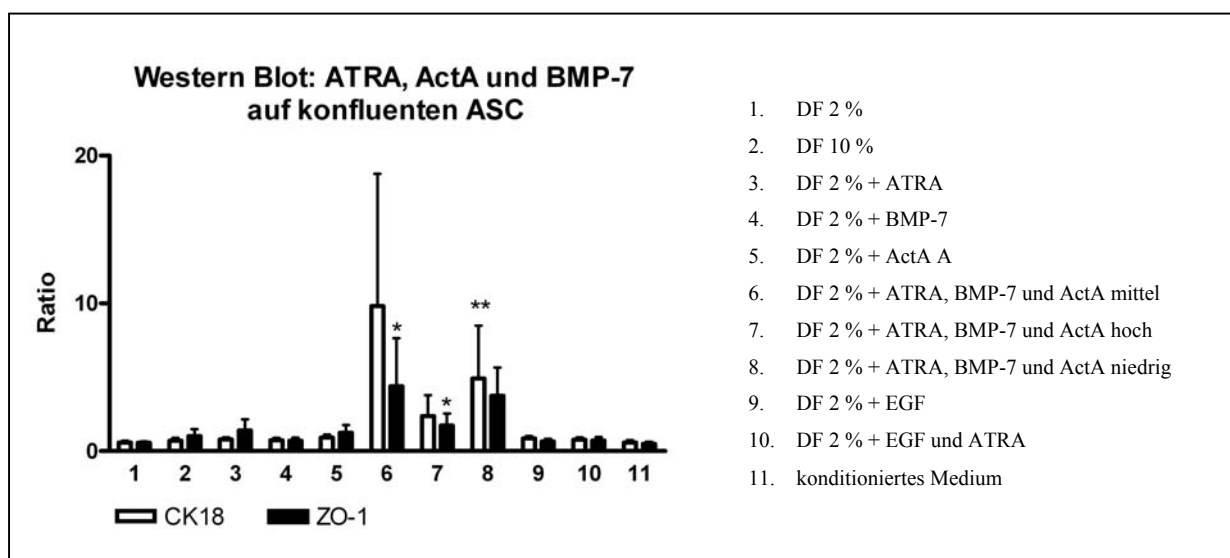


Abb. 20 Proteinexpression von CK18 und ZO-1 nach 14-tägiger Kultur mit ATRA, Aktivin A und BMP-7 bei konfluenten Zellen (Western Blot, densitometrische Auswertung); die Abbildung zeigt elf verschiedene Medienzusammenstellungen basierend auf DMEM plus 2% FKS (CK18 $n=8$; ZO-1 $n=6$). (* = statistisch signifikant (p -Werte $< 0,05$); ** = statistisch hochsignifikant (p -Werte $< 0,01$)).

Bei der qPCR wurde CK18 bei dem Zusatz von ATRA und der Mischung aus ATRA, ActA und BMP-7 in allen Konzentrationen signifikant erhöht exprimiert. ATRA alleine verursachte eine mit $4,80 \pm 3,31$ deutlich geringere Erhöhung der CK18 Expression im Vergleich zu der Kombination aus ATRA, ActA und BMP-7 (ATRA, ActA, BMP-7 mittlere Konzentration $7,73 \pm 2,52$; Mischung 2: ATRA, ActA, BMP-7 hohe Konzentration $7,75 \pm 7,76$; Mischung 3: ATRA, ActA, BMP-7 niedrige Konzentration $7,27 \pm 8,55$). Die Aquaporin 1 Expression nahm bei der Mischung 1 und 2, sowie bei den EGF enthaltenden Medien signifikant ab. ZO-1 und Occludin wurden nicht signifikant beeinflusst, während die wnt-4 Expression hoch signifikant vermindert war, wenn ATRA oder EGF und ATRA dem Medium zugesetzt wurden.

Konditioniertes Medium verursachte ebenfalls eine Reduktion der wnt-4 Expression. Die E-Cadherin Expression wurde bei der Zugabe von EGF reduziert.

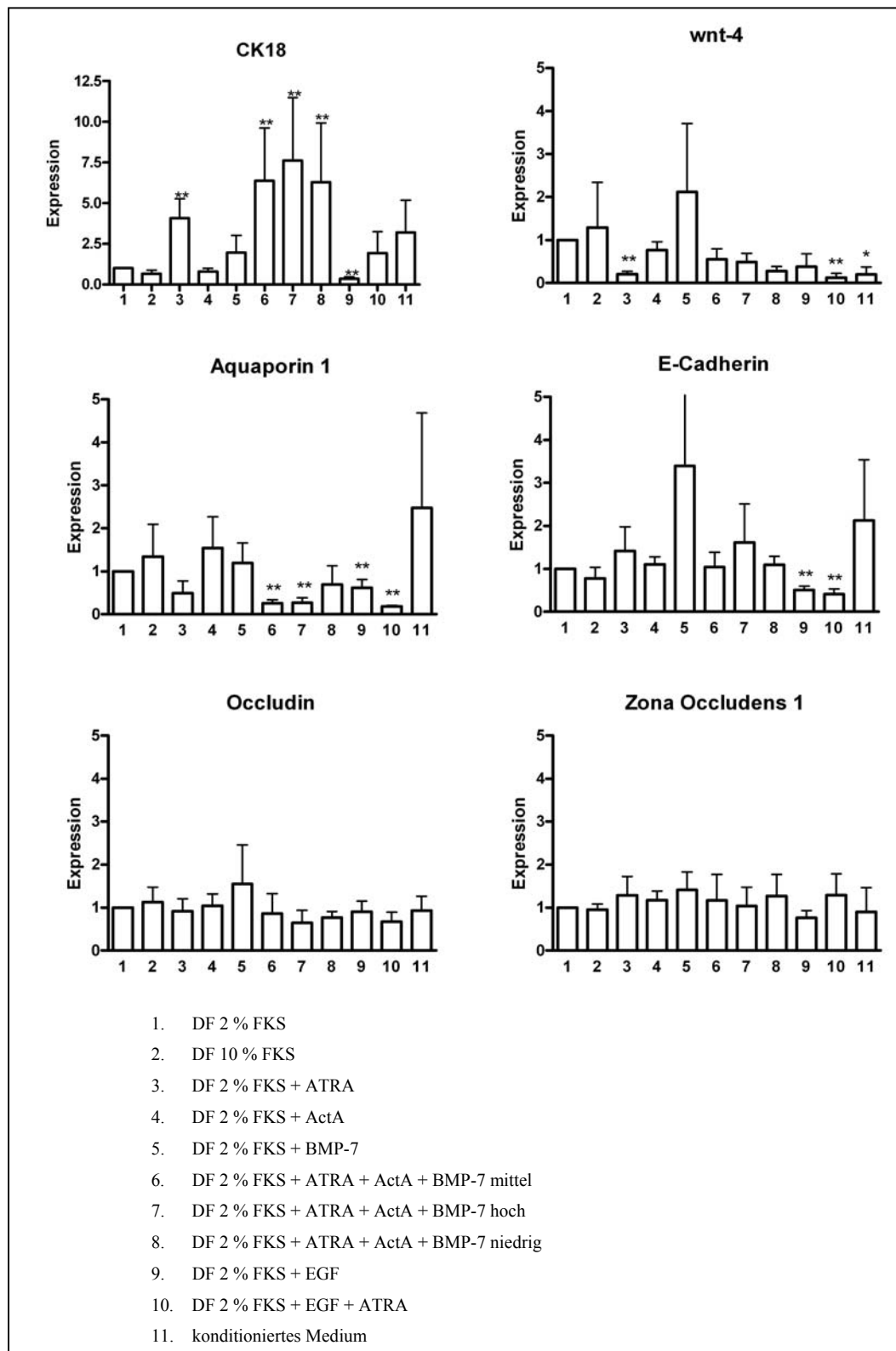


Abb. 21 qPCR von ASC nach der Behandlung mit ATRA, Aktivin A und BMP-7; es wurden sechs verschiedene Gene untersucht: CK18, wnt-4, E- Cadherin, Aquaporin 1, Occludin und Zona Occludens Protein 1 (n=6).(* = statistisch signifikant (p-Werte < 0,05); ** = statistisch hochsignifikant (p-Werte <0,01)).

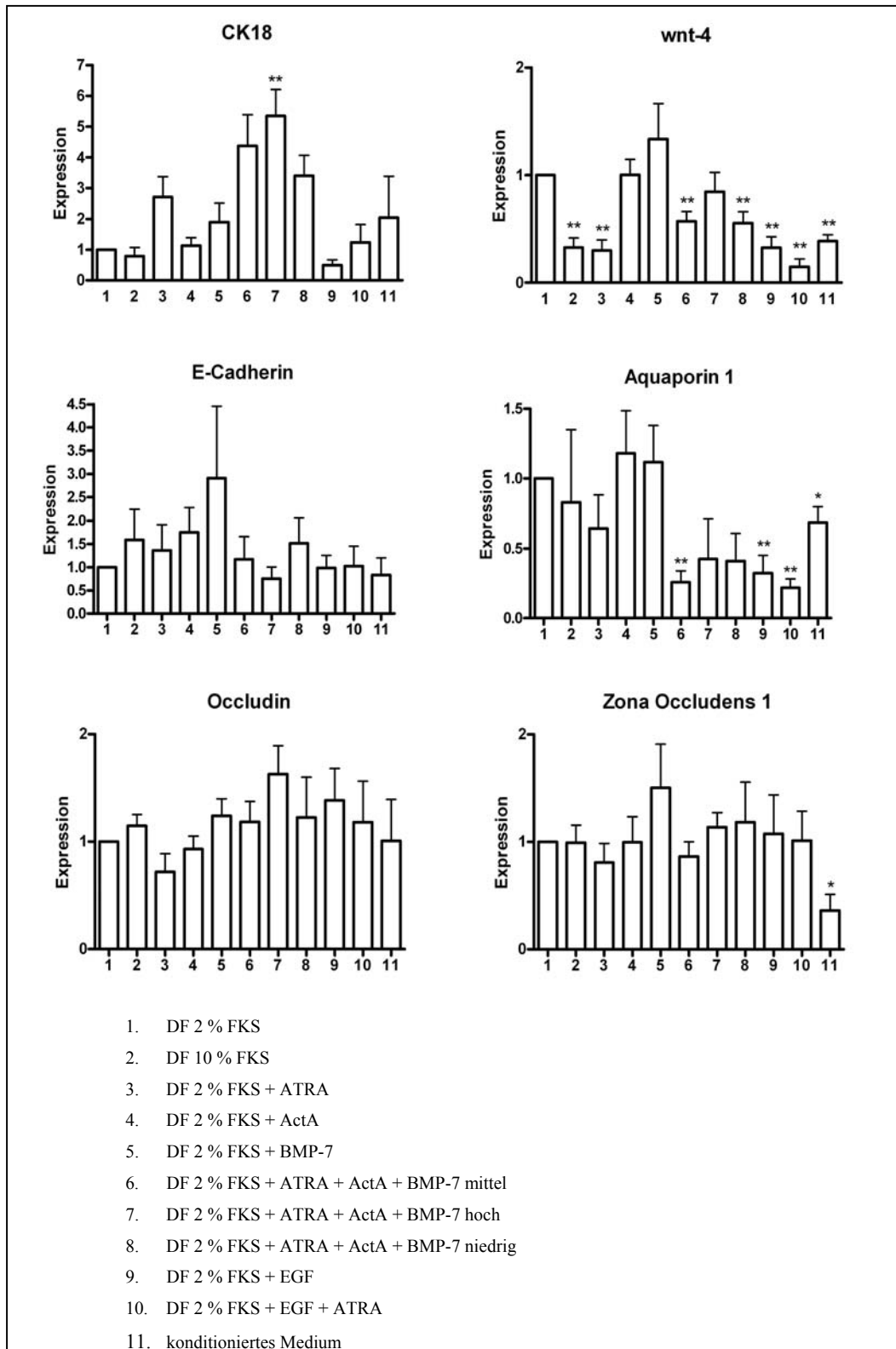


Abb. 22 qPCR von konfluenten ASC nach der Behandlung mit ATRA, Aktivin A und BMP-7; es wurden sechs verschiedene Gene untersucht: CK18, wnt-4, E- Cadherin, Aquaporin 1, Occludin und Zona Occludens Protein 1 (n=6). * = statistisch signifikant (p-Werte < 0,05); ** = statistisch hochsignifikant (p-Werte < 0,01).

Bei konfluenten Zellen als Ausgangspunkt war nur nach Zugabe der hohen Konzentration von ATRA, ActA und BMP-7 eine signifikante Erhöhung der CK18 Expression zu erkennen ($5,35 \pm 2,1$). Die Werte der anderen gemischten Medien waren aber mit $4,40 \pm 2,5$ und $3,41 \pm 1,6$ ebenfalls erhöht. Die wnt-4 Expression war in den meisten Medien reduziert, während die Expression von ZO-1, Occludin und E-Cadherin nicht deutlich verändert wurde. Die Expression von Aquaporin 1 wurde nach Zugabe von ATRA, ActA und BMP-7 in der mittleren Konzentration und konditioniertem Medium, sowie der Zugabe von EGF oder EGF und ATRA signifikant verringert.

In der Immunfluoreszenz konnte hingegen eine deutliche Zunahme an ZO-1 nachgewiesen werden. Die Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop zeigen die panCK Expression (FITC = grün), die ZO-1 Expression an den Zell-Zell-Kontakten (GamCy3 = rot) und die Zellkerne (DAPI Färbung = blau). Die Positivkontrolle bestand aus Tubuluszellen und zeigte ausschließlich Zytokeratin positive Zellen und eine eindeutige ZO-1 Färbung an den Zellgrenzen. Als Negativkontrolle dienten nicht induzierte ASC, die in DMEM mit 2% FKS kultiviert wurden. Nach der Kultivierung mit Aktivin A war eine Zytokeratin Expression zu erkennen, wobei aber die typische Filamentstruktur von Zytokeratin nicht vorhanden war. Die Zytokeratin Struktur war unter keinem der verwendeten Medien als Filament zu erkennen, anders als bei den Tubuluszellen. ZO-1 war nur diffus vorhanden. Konditioniertes Medium induzierte ebenfalls eine Zytokeratin Expression in einigen Zellen, aber kein ZO-1. Die Zugabe von EGF führte ebenfalls nur zu einer leichten Expression von Zytokeratin, während die Kombination aus ATRA und EGF eine deutliche panCK Expression induzierte. ZO-1, durch dieses Medium ebenfalls aktiviert, war an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, schloss aber nicht jede Zelle vollständig ein. Bei der Verwendung von ATRA alleine zeigte sich größtenteils eine panCK Färbung, ZO-1 war hingegen nur diffus exprimiert. Der Zusatz von ATRA, Aktivin A und BMP-7 gemeinsam führte in jeder gewählten Konzentration zu einer sehr deutlichen Abgrenzung der Zellen voneinander durch ZO-1 und einer Expression von panCK.

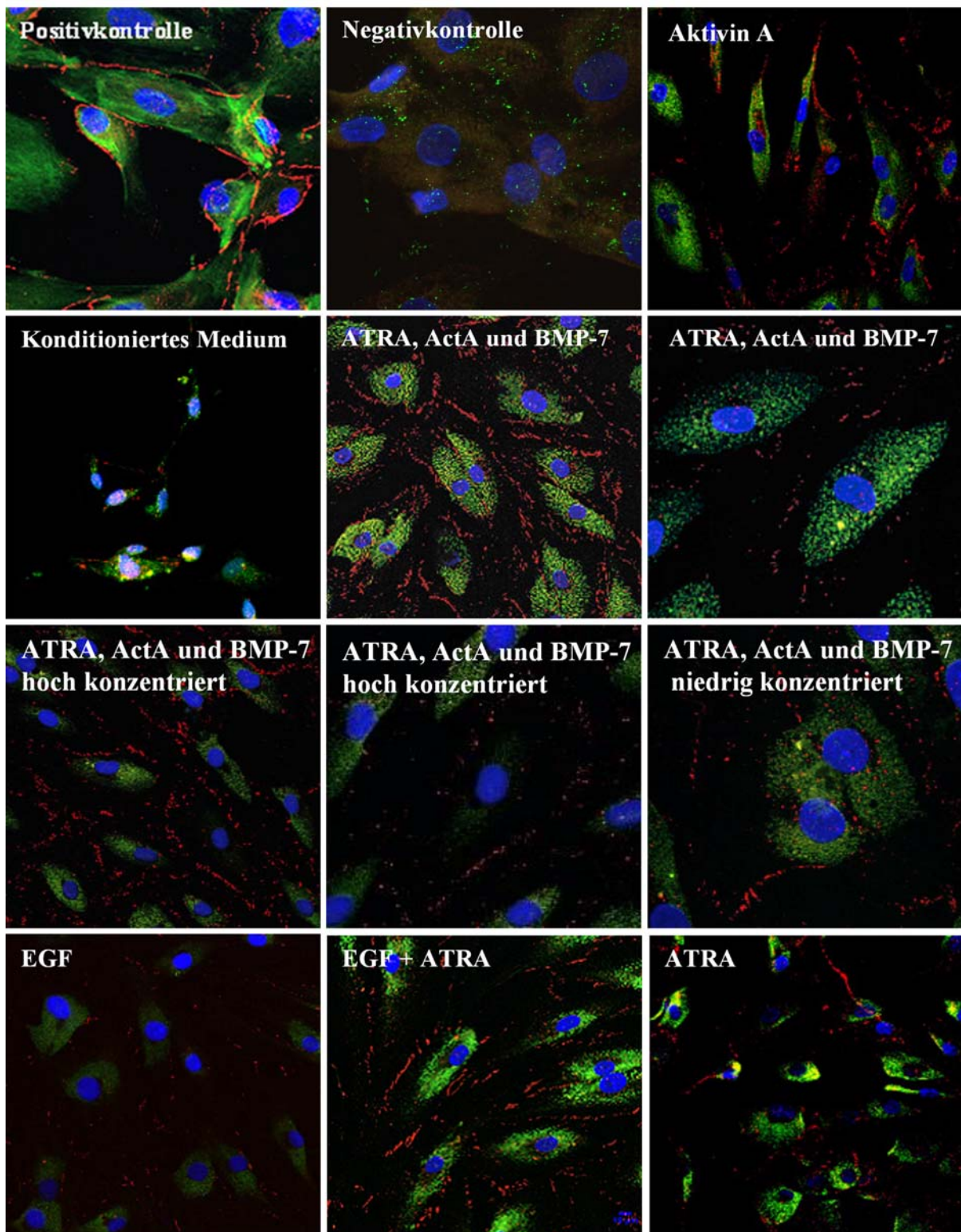


Abb. 23 Immunfluoreszenzfärbungen von ASC nach der Kultur mit verschiedenen Medien zur Differenzierung in Epithelzellen (konfokale Mikroskopie, Stacks); die Abbildung zeigt die Expression von panCK (FITC) und ZO-1(Cy3) nach 14 Tagen Kultur mit verschiedenen Medienzusätzen. Die erste Reihe zeigt eine Positivkontrolle aus Tubuluszellen und die Negativkontrolle von ASC, sowie die Kultivierung mit Aktivin A. In den nächsten beiden Reihen sind die drei in verschiedener Konzentration eingesetzten Faktoren ATRA, Aktivin A und BMP-7 und konditioniertes Medium dargestellt. Darunter sind die Zellen nach der Kultur mit EGF, EGF plus ATRA und ATRA alleine zu sehen.

Abbildung 24 zeigt Fluoreszenzfärbungen mit Zytokeratin 18 nach 14 Tagen Kultur mit verschiedenen Medienzusätzen aus ATRA, ActA und BMP-7, sowie EGF. Konditioniertes Medium (kM) wurde ebenfalls verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die

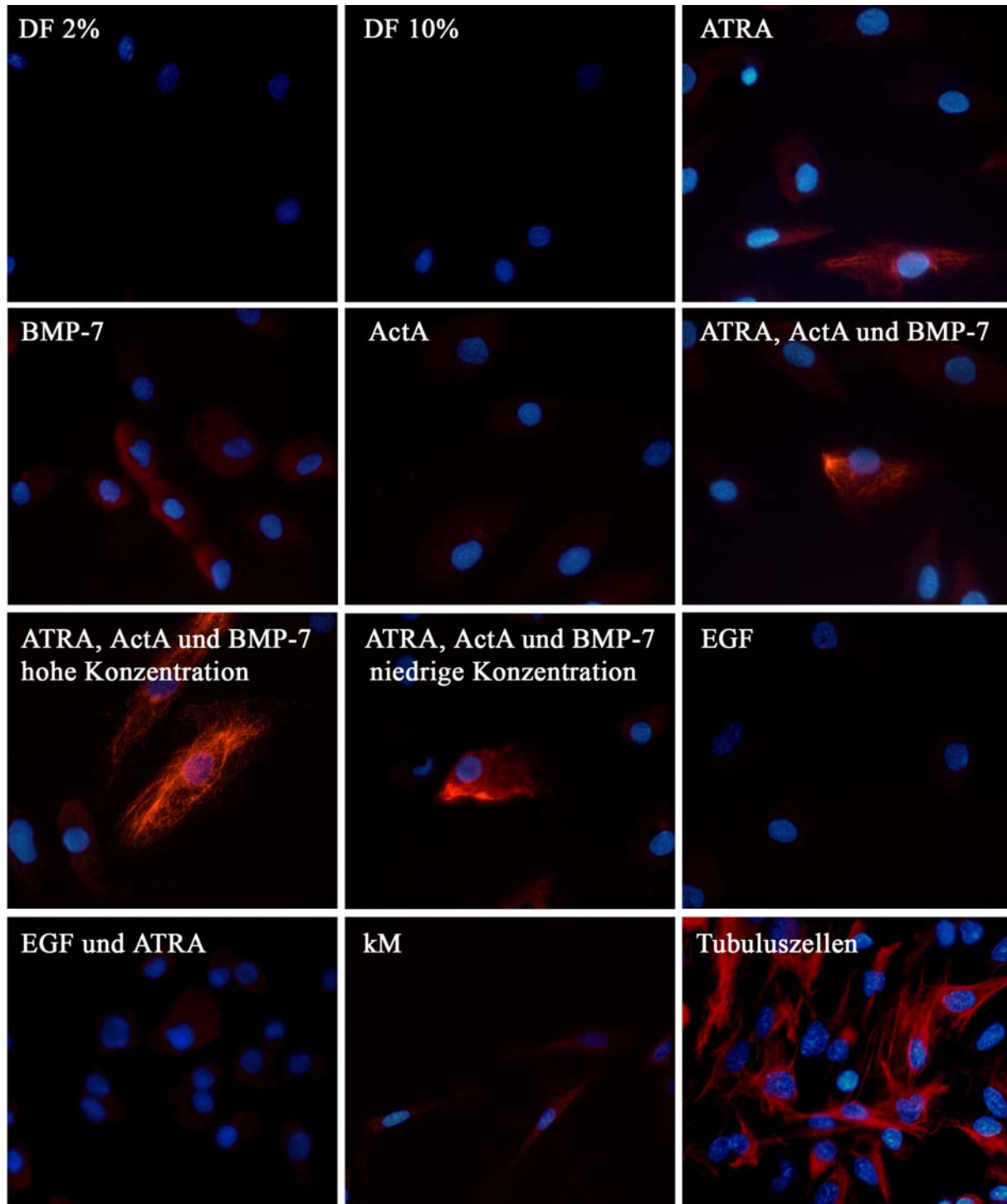


Abb. 24 Fluoreszenzfärbung mit Zytokeratin 18 bei der Induktion der epithelialen Differenzierung mit ATRA, ActA und BMP-7 (normale Fluoreszenzmikroskopie); es konnte gezeigt werden, dass ATRA und die Kombination aus ATRA, ActA und BMP-7 eine deutliche CK18 Expression mit der typischen Filamentstruktur induzieren. Das letzte Bild zeigt ein Beispiel für Tubuluszellen, die mit Zytokeratin gefärbt wurden (Vergrößerung 630x mit Öl).

Kultur der ASC mit DF 2% diente als Negativkontrolle, kultivierte Tubuluszellen sind als Positivkontrolle aufgeführt. Der Zusatz von ActA, BMP-7, EGF, EGF plus ATRA oder konditioniertem Medium führten zu einer leichten CK18 Expression. Nach der Kultur mit ATRA alleine oder einer Kombination aus ATRA, ActA und BMP-7 war eine deutliche Expression von CK18 mit einer vollständigen Filamentstruktur zu erkennen, während einige weitere ASC nur leicht gefärbt waren. Bei der Zugabe der kombinierten Faktoren schien die Anzahl der für den epithelialen Marker positiven ACS größer zu sein als bei der Kultur mit ATRA allein.

3.1.2. HGF-ELISA

In diesem Immunassay wurde der Einfluss von verschiedenen Faktoren abhängig von der Konzentration auf die HGF Sezernierung der Zellen untersucht. Dafür wurde das Medium nach zwei und vier Tagen gesammelt und analysiert. Als Medienzusätze wurden zuerst der Tumornekrosefaktor (TNF) (Konzentrationen: 10ng/ml, 0,1ng/ml und 0,1ng/ml), Interferon (IFN) (200U/ml, 20U/ml und 2U/ml), Interleukin 1 beta (IL1 β) (25U/ml, 2,5U/ml und 0,25U/ml), sowie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) (100ng/ml) verwendet. Zusätzlich wurde eine Mischung aus TNF, IFN und IL1B in den Konzentrationen 10ng/ml, 200U/ml und 25U/ml (bezeichnet als Cytomix) getestet.

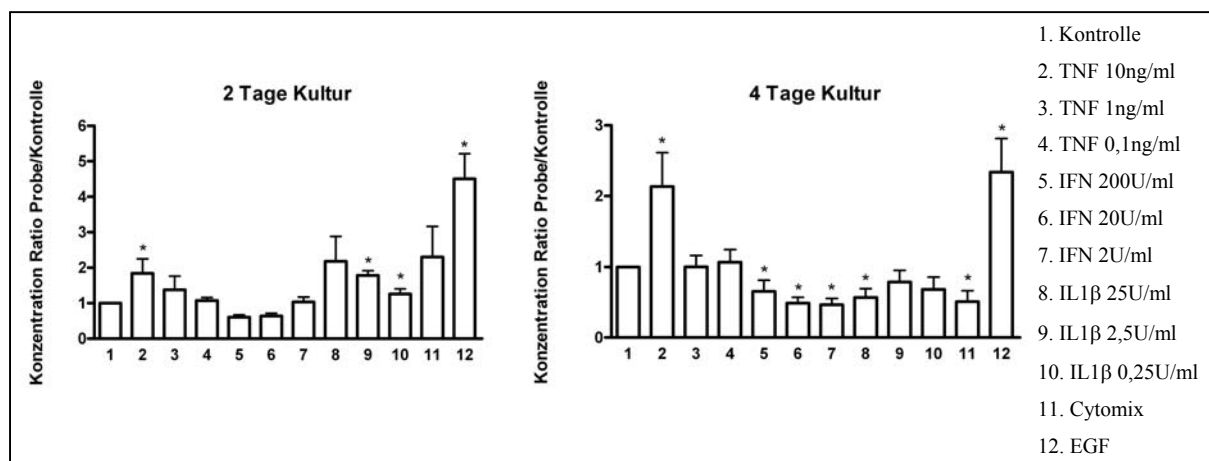


Abb. 25 Vergleich verschiedener Medienzusätze für die Produktion von ASC von HGF; (n=4)(* = statistisch signifikant (p-Werte < 0,05).

Nach zwei Tagen zeigte sich, dass TNF, IL1 β und der Cytomix eine Erhöhung der HGF Ausscheidung hervorriefen. Als Kontrolle diente DMEM Medium + 10% FKS, mit der bei der Analyse der Ergebnisse die Ratio gebildet wurde. Die Zugabe von TNF führte zu einem Anstieg der HGF Menge im Medium. Dabei verhielt sich die HGF Menge proportional zur

eingesetzten TNF Konzentration. Nach Zusatz von 10ng/ml TNF war die Erhöhung des HGFs signifikant. IFN führte zu keiner deutlichen Veränderung der HGF Sezernierung, während IL1 β , ebenfalls abhängig von der Konzentration, eine signifikante Erhöhung der HGF Sezernierung hervorrief. Die höchste Konzentration von 25U/ml war dabei nicht statistisch signifikant, stellte aber in Zahlen den höchsten HGF Gehalt im Medium dar. Dies kann wahrscheinlich auf die starke Streuung der ermittelten Werte bei diesen Proben zurückgeführt werden. Der Cytomix zeigte ebenfalls eine nicht signifikante Erhöhung des HGF Wertes mit hoher Standardabweichung. Am deutlichsten erhöhte sich die HGF Konzentration im Medium aber bei der Zugabe von EGF. Der ermittelte HGF Wert entsprach dem $4,50 \pm 1,42$ -fachen der Kontrolle. Nach vier Tagen zeigte sich, dass 10ng/ml TNF eine doppelt so hohe Exkretion von HGF stimulierte ($p=0,029$), während bei der Anwendung von IFN unabhängig von der Konzentration und von IL1 β 0,25U/ml eine statistisch signifikante Reduktion zu erkennen war.

Tab. 9 Vergleich der HGF Sezernierung nach zwei und vier Tagen Kultur mit unterschiedlichen Medien (n=4)

Ratio HGF Menge Probe/Kontrolle	Mittelwert \pm SD 2d	Mittelwert \pm SD 4d
Kontrolle	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
TNF 10ng/ml	1,84 \pm 0,81	2,13 \pm 0,96
TNF 1ng/ml	1,38 \pm 0,77	1,00 \pm 0,32
TNF 0,1ng/ml	1,68 \pm 1,22	1,07 \pm 0,36
IFN 200U/ml	0,82 \pm 0,44	0,66 \pm 0,32
IFN 20U/ml	0,86 \pm 0,45	0,49 \pm 0,16
IFN 2U/ml	0,86 \pm 0,40	0,47 \pm 0,18
IL1 β 25U/ml	2,18 \pm 1,39	0,57 \pm 0,25
IL1 β 2,5U/ml	2,34 \pm 1,12	0,79 \pm 0,33
IL1 β 0,25U/ml	1,95 \pm 1,40	0,68 \pm 0,35
Cytomix	2,30 \pm 1,73	0,51 \pm 0,32
EGF	4,50 \pm 1,42	2,34 \pm 0,95

Da EGF eine starke Wirkung auf die HGF Sezernierung der ASC hervorgerufen hatte, wurden im weiteren Verlauf vier verschiedene Konzentrationen getestet: 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml,

0,1ng/ml. Außerdem wurde der Cytomix in drei verschiedenen Konzentrationen (entsprechend der Einzelkonzentrationen der Komponenten) und die Wachstumsfaktoren bFGF (10ng/ml) und VEGF (50ng/ml), sowie der Leukämie-hemmende Faktor (LIF, 20ng/ml) und Aktivin A (10ng/ml) untersucht.

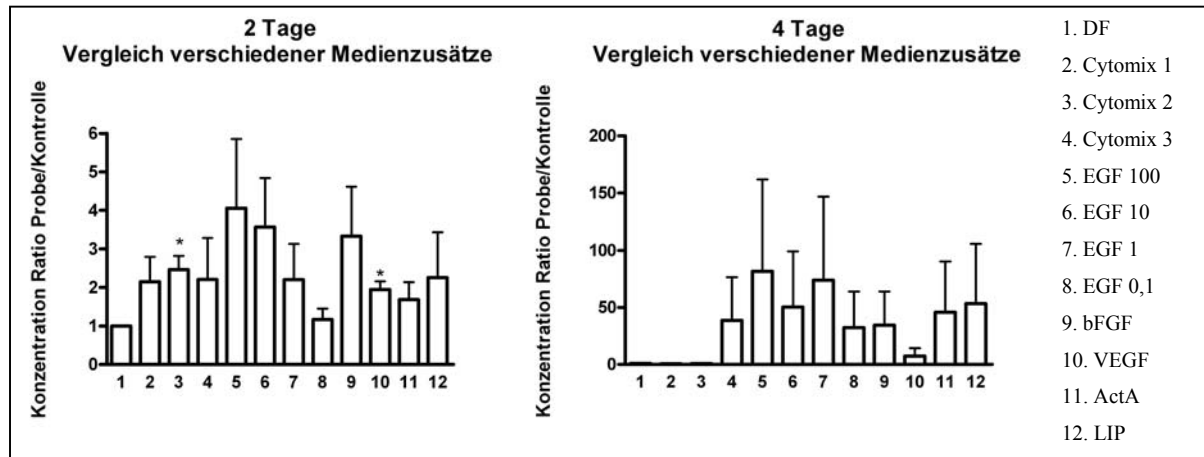


Abb. 26 Vergleich von verschiedenen Wachstumsfaktoren und einem Zytokin- Mix zur Induktion der Produktion der ASC von HGF; (n=3)(* = statistisch signifikant (p-Werte < 0,05)).

Tab. 10 Vergleich der HGF Sezernierung nach zwei und vier Tagen Kultur mit unterschiedlichen Kulturmedien (EGF) (n=3)

Ratio HGF Menge Probe/Kontrolle	Mittelwert \pm SD 2d	Mittelwert \pm SD 4d
DF	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
Cytomix 1	2,15 \pm 1,11	0,65 \pm 0,36
Cytomix 2	2,46 \pm 0,63	0,68 \pm 0,28
Cytomix 3	2,21 \pm 1,87	38,65 \pm 65,86
EGF 100	4,05 \pm 3,11	81,70 \pm 138,88
EGF 10	3,57 \pm 2,20	50,45 \pm 84,58
EGF 1	2,20 \pm 1,60	73,96 \pm 126,20
EGF 0,1	1,17 \pm 0,48	32,31 \pm 54,81
bFGF	3,33 \pm 2,23	34,43 \pm 50,97
VEGF	1,95 \pm 0,37	7,39 \pm 12,08
Akt	1,68 \pm 0,78	45,78 \pm 77,32
LIF	2,25 \pm 2,04	1,00 \pm 0,00

Die HGF-Konzentration war nach der Zugabe des Cytomixes im Durchschnitt um das 2,27-fache erhöht, wobei nur die mittlere Konzentration nach zwei Tagen statistisch signifikant war. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Induktion der HGF Produktion durch das EGF abhängig von der Konzentration war. Je höher die eingesetzte Konzentration war, desto höher war die nachgewiesene HGF Menge. Um mehr als das doppelte erhöht waren die Werte bei der Stimulierung mit bFGF (3,32-fach) und LIF (2,25-fach). Sowohl diese Ergebnisse als auch die des EGF waren nicht statistisch signifikant und hatten hohe Standardabweichungen. Signifikant war nach zwei Tagen allerdings noch die Erhöhung der HGF Sezernierung durch VEGF auf das 1,95-fache.

3.2. Einfluss von extrazellulären Matrices auf die Differenzierung von Stammzellen aus Fettgewebe

Extrazelluläre Matrix beeinflusst die Zellen, die mit ihr in Kontakt stehen, wodurch ihre Wirkung auf die Differenzierung von Stammzellen von Interesse ist. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze untersucht: zum einen wurde eine von Tubuluszellen gebildete extrazelluläre Matrix als Beschichtung verwendet und zum anderen wurde Matrigel verwendet, welches aufgrund seiner Zusammensetzung die Basallamina simuliert.

3.2.1. Extrazelluläre Matrix aus Tubuluszellen

Epitheliale Tubuluszellen aus der Niere bilden bei der *in vitro* Kultur in Plastikkulturgefäßen eine extrazelluläre Matrix aus. Durch ein vorsichtiges Ablösen der Zellen, kann die Matrix auf der Oberfläche des Zellkulturgefäßes erhalten bleiben und als Beschichtung für andere Zellen verwendet werden. Trypsin als eine Endopeptidase (Serinprotease), spaltet extrazelluläre Proteine bei kurzer Einwirkzeit und kann daher nicht verwendet werden. Es wurden verschiedene Chemikalien auf ihre vollständige Lösung der Zellen sowie einen möglichst großen Anteil an extrazellulärer Matrix auf der Plastikoberfläche getestet. Dafür wurden sechs verschiedene Lösungen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen ausgetestet: 2M und 10M EDTA, 2M Urea, 0,05% Triton-x-100 in PBS, 0,02M NH_4OH in H_2O und eine Mischung aus 0,05% Triton-x-100 und 0,02M NH_4OH in PBS. EDTA ist ein Komplexbildner, Urea denaturiert Proteine indem nicht-kovalente Bindungen unterbrochen werden und Triton-x-100 ist ein nicht-inonisches Detergenz. Der Nachweis der extrazellulären Matrix erfolgte über eine

Coomassie Blau Färbung und elektronenmikroskopische Aufnahmen. Zusätzlich konnte die ECM auch schon mikroskopisch erkannt werden (Abbildung 28).

Es zeigte sich, dass als Lösungsmittel für die Tubuluszellen die Lösung aus 0,05% Triton-x-100 und 0,02M NH_4OH in PBS am besten geeignet war (Abb. 27H), da EDTA die Zellen unvollständig löste (Abb. 27B) und kaum eine extrazelluläre Matrix auf der Plastik hinterließ (Abb. 27C) und die Verwendung von Urea die Matrix größtenteils entfernte (Abb. 27D). Einzeln verwendet funktionierten die Lösungen aus 0,05% Triton-x-100 (Abb. 27E) und 0,02M NH_4OH in H_2O (Abb. 27F) ebenfalls. Für die folgenden Versuche wurde 0,05% Triton-x-100 und 0,02M NH_4OH verwendet.

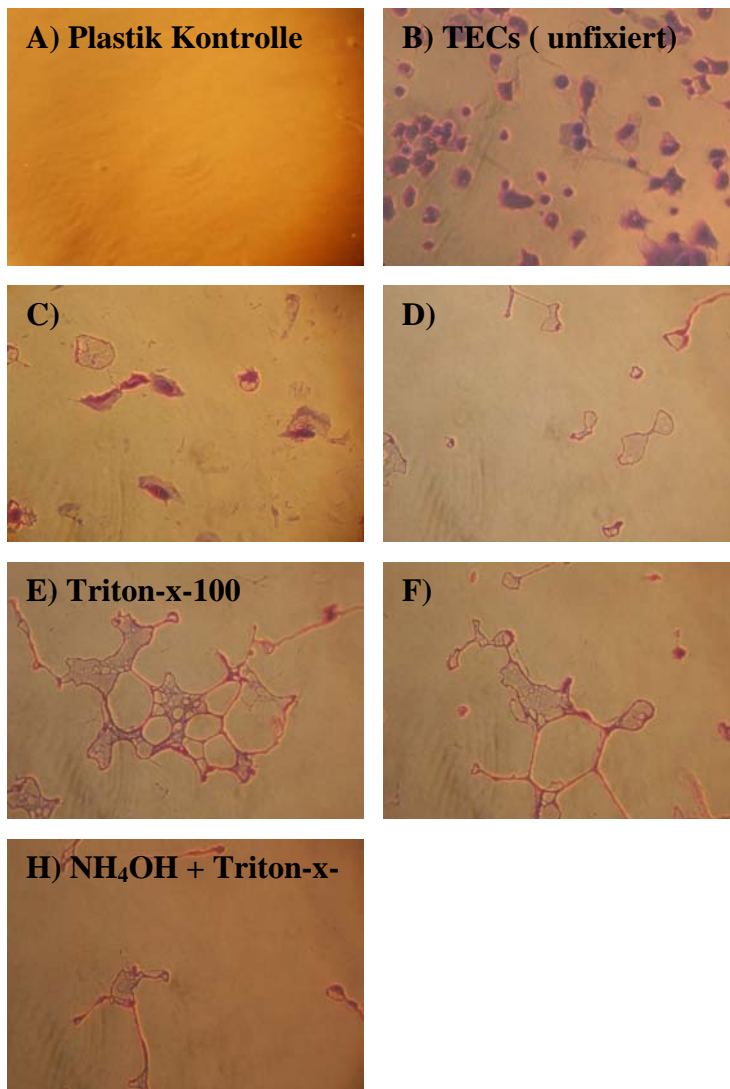


Abb. 27 Vergleich der extrazellulären Matrix nach dem Ablösen der Tubuluszellen mit unterschiedlichen Lösungen; die Einwirkzeit betrug 15 Minuten. Die Bilder A und B dienen der Negativ- und Positivkontrolle. Nach Verwendung von EDTA war kaum eine extrazelluläre Matrix erhalten, dafür aber noch haftende Zellen, während die Anwendung von Urea zwar alle Zellen, aber auch die Matrix fast vollständig entfernte. NH_4OH und Triton-x-100 wiesen kaum Unterschiede auf, hinterließen keine lebenden Zellen, aber den höchsten Anteil an extrazellulärer Matrix (100× Vergrößerung).

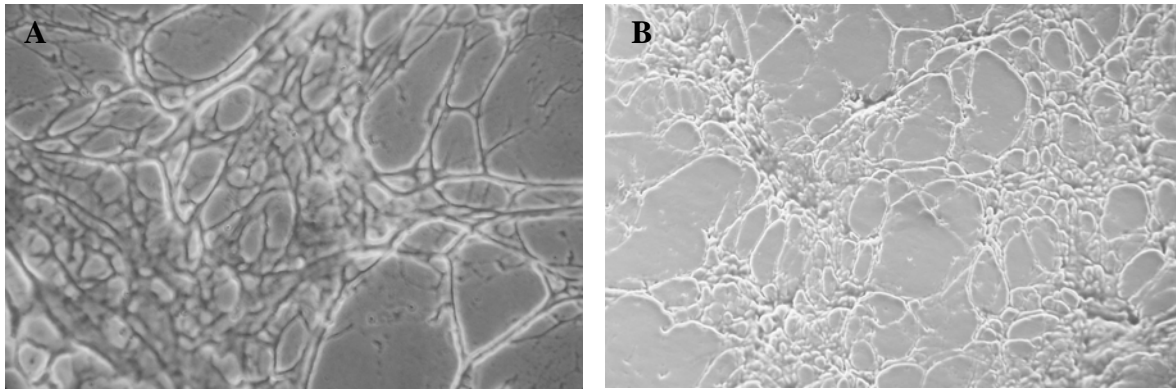


Abb. 28 Mikroskopische Aufnahme der Extrazellulären Matrix von der Negativfraktion; Abbildung A hat eine 200x Vergrößerung, Abbildung B zeigt eine 50x Vergrößerung.

Abbildung 29 zeigt Aufnahmen der extrazellulären Matrix mit dem Raster-Elektronenmikroskop. Im Vergleich zu der Plastikkontrolle (A und B) ist auf den in diesem Beispiel mit proximalen Tubuluszellen beschichteten Proben eine deutlich vernetzte Matrix zu erkennen.

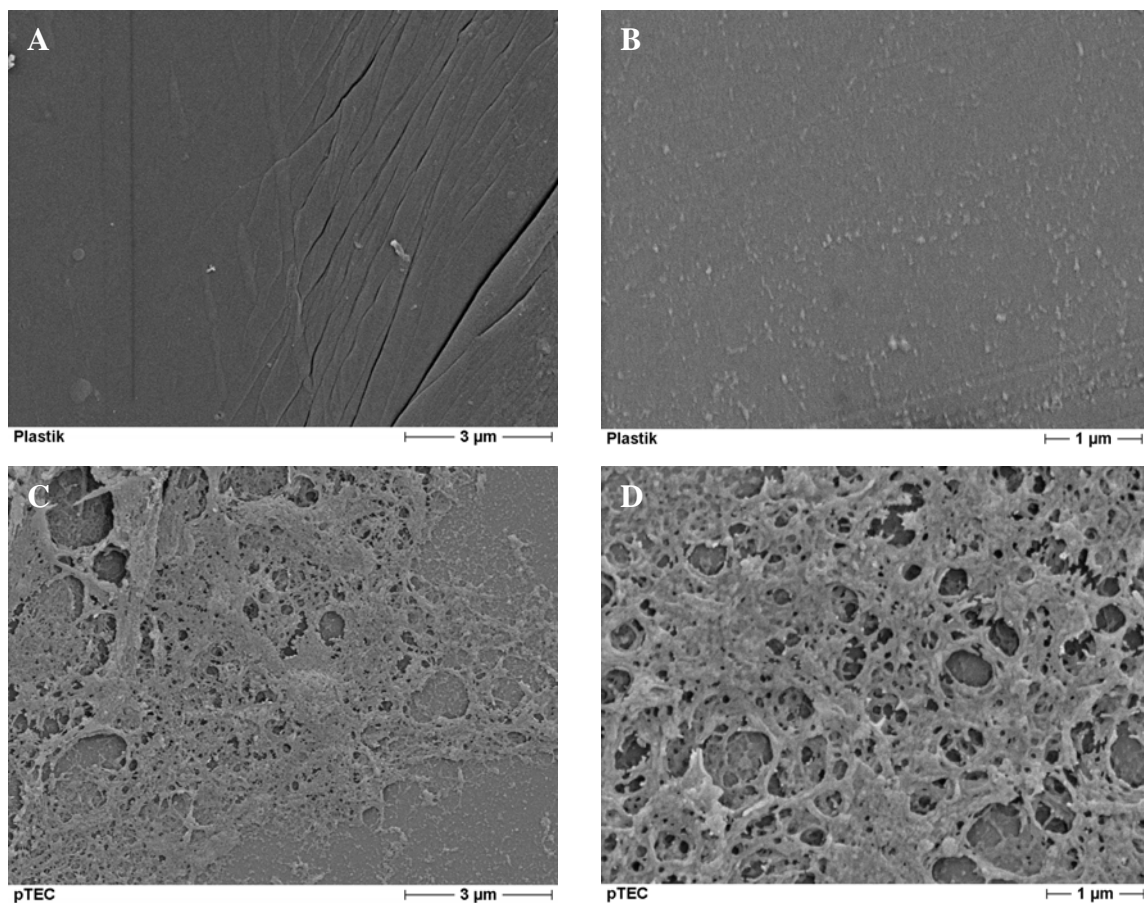


Abb. 29 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von unbeschichteten Plastik Oberflächen im Vergleich zu der extrazellulären Matrix aus proximalen Tubuluszellen; die Bilder A und B zeigen die Kontrolle (10000 \times und 20000 \times), die Bilder C und D die extrazelluläre Matrix aus proximalen Tubuluszellen (10000 \times und 20000 \times).

Die densitometrische Auswertung der Western Blots zeigte, dass die Zugabe von ATRA die ZO-1 und CK18 Expression leicht erhöhte, die extrazelluläre Matrix aus Tubuluszellen jedoch die Expression beider Marker verringerte. Selbst die zusätzliche Kultur mit ATRA führte bei der Kultur der ASC auf der extrazellulären Matrix nicht zu einer Erhöhung der ZO-1 und CK18 Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die anderen verwendeten löslichen Faktoren (bFGF, bFGF/VEGF, WT-Mix) reduzierten die CK18 Expression unabhängig von der Beschichtung. Die ZO-1 Expression war ebenfalls geringer als bei der Kontrolle mit DF 10%.

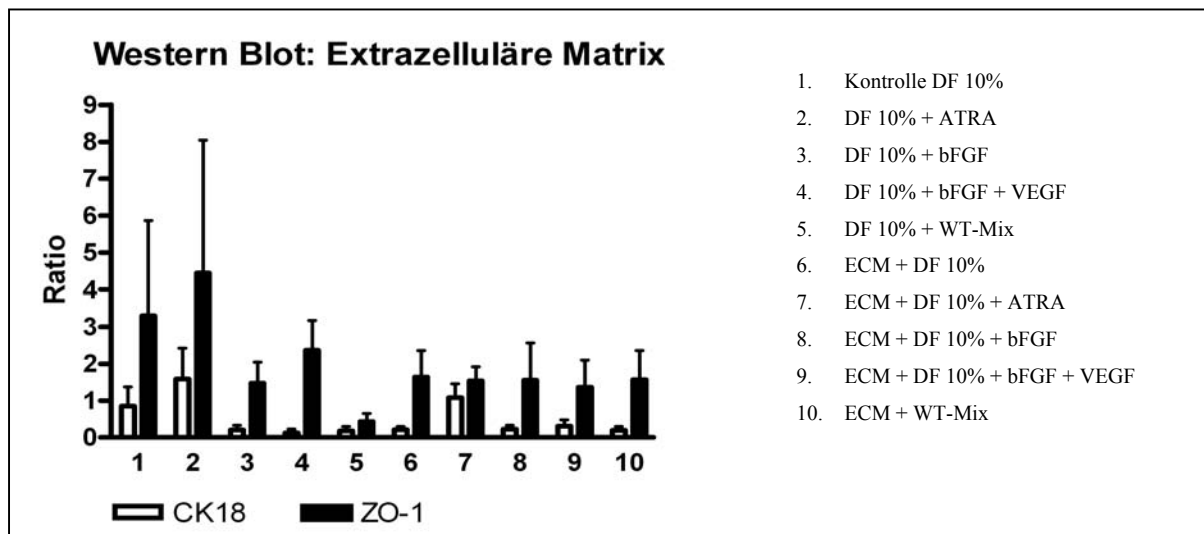


Abb. 30 Zytokeratin 18 und Zona Occludens 1 Expression nach 14 Tagen Kultur mit verschiedenen Wachstumsfaktoren auf einer extrazellulären Matrix von Tubuluszellen und auf Plastik (Western Blot, densitometrische Auswertung) (n=5 für CK18; n=3 für ZO-1).

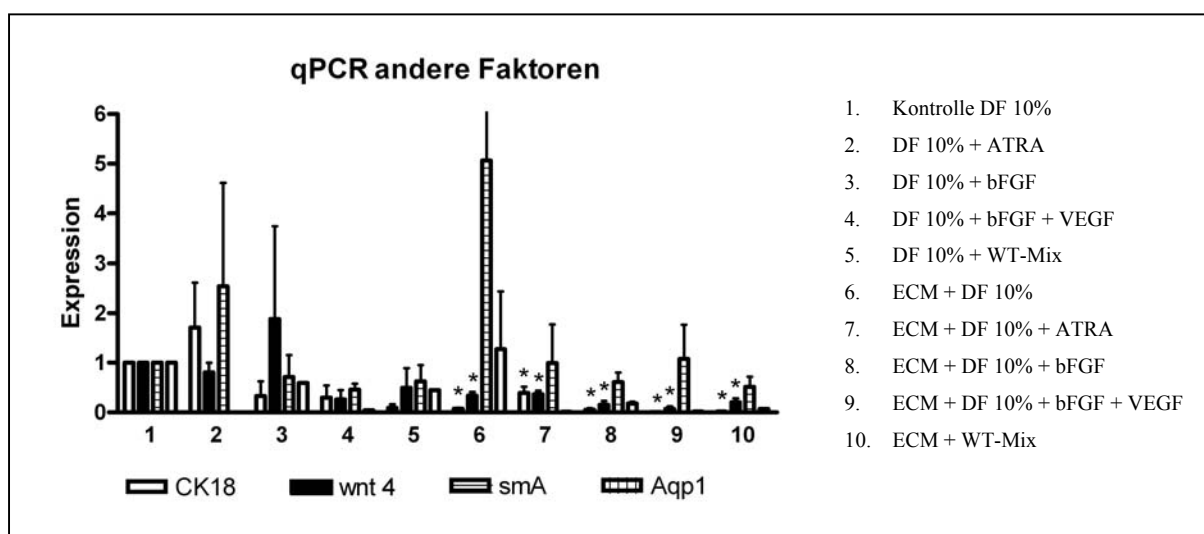


Abb. 31 qPCR Ergebnisse: Zytokeratin 18, wnt-4, smA und Aquaporin 1 Expression nach 14 Tagen Kultur mit verschiedenen Wachstumsfaktoren auf einer extrazellulären Matrix von Tubuluszellen; (n=4)(* = statistisch signifikant)..

In der qPCR wurden der CK18, wnt-4, smooth muscle actin (smA) und Aquaporin 1 untersucht. Verschiedene Wachstumsfaktoren wurden mit und ohne Beschichtung mit extrazellulärer Matrix von Tubuluszellen analysiert. Die Werte schwankten zwischen den einzelnen Versuchen stark. Bei der Kultur auf extrazellulärer Matrix waren die CK18 sowie die wnt-4 Expression signifikant reduziert. ATRA ohne eine extrazelluläre Matrix zeigte eine leichte Erhöhung von CK18.

3.2.2. Matrigel

Matrigel wurde auf zwei verschiedene Weisen verwendet: 1. als Zusatz zum Medium und 2. als Beschichtung. Bei der Beschichtung wurde das Matrigel zum einen verdünnt verwendet, wobei der Einfluss verschiedener Matrigelkonzentrationen ermittelt wurde, und zum anderen wurde es pur für eine 3D Kultur eingesetzt. Unter Verwendung von Western Blotting und qPCR wurde die Differenzierung in Richtung epithelialer Zellen untersucht. Die Anordnung von ASC in der 3D Kultur wurde durch eine DAPI Färbung ermittelt. Zusätzlich wurde eine ZO-1 und CK18 Immunfluoreszenzfärbung in der 3D Kultur durchgeführt.

Morphologisch zeigte sich, dass sich die ASC bei der Kultur auf einer dicken Schicht Matrigel zusammenlagerten und untereinander Verbindungen ausbauten.

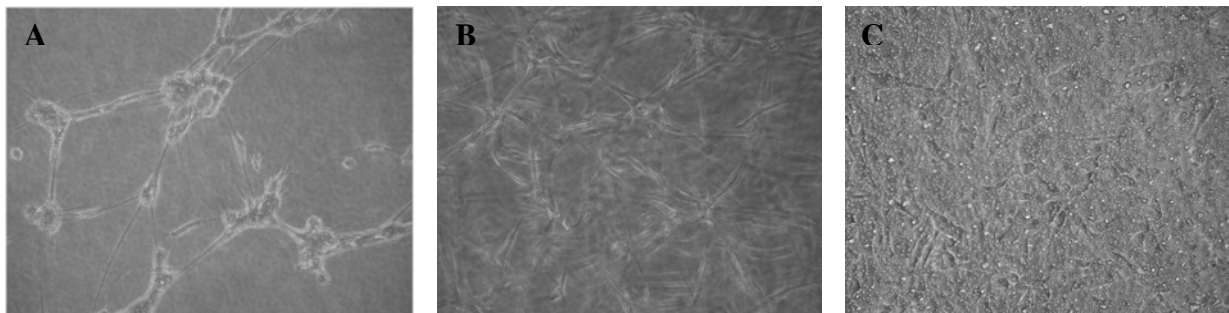


Abb. 32 3D Kultur auf Matrigel; die Abbildungen A und B zeigen ASC nach 14 Tagen Kultur auf Matrigel (dicke Beschichtung). Das Bild C zeigt zur Kontrolle auf der Membran gewachsene ASC ohne Beschichtung.

Die Kultur auf einer dünnen Schicht Matrigel zeigte in der Morphologie sehr unterschiedliche Ergebnisse abhängig von den verwendeten ASC und damit von der Isolation. Entweder wiesen die ASC nach 14 Tagen keine Veränderungen auf, unabhängig von der eingesetzten Menge an Matrigel, oder es wurde eine Veränderung in unterschiedlicher Stärke induziert. Dabei zeigten die ACS eine tubulusartige Zusammenlagerung, die ebenfalls nicht von der Matrigelkonzentration abhing. Schon bei dem Einsatz von 100µg Matrigel/ml konnten diese Strukturänderungen nachgewiesen werden.

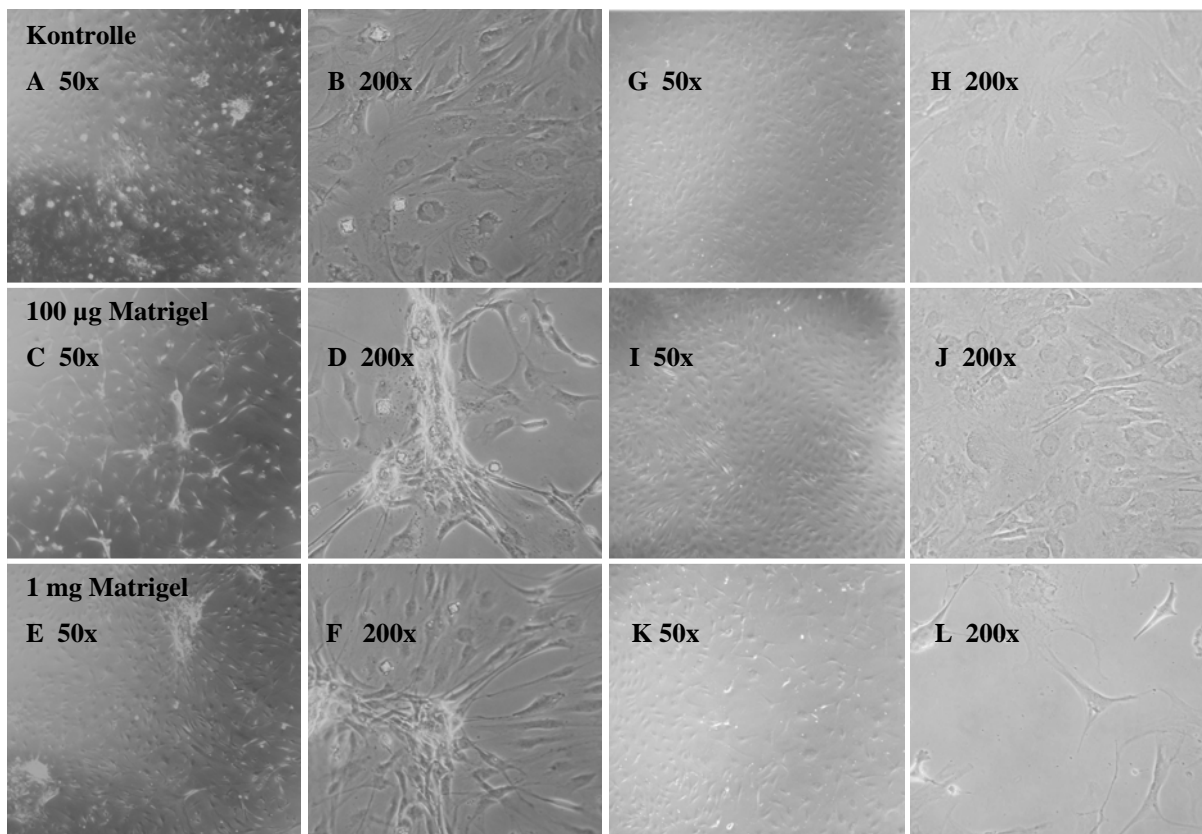


Abb. 33 Vergleich der Morphologie von ASC nach 14-tägiger Kultur auf Matrigel aus zwei Versuchen; die Bilder auf der linken Seite (A-F) zeigen deutlich veränderte Zellen. Bei dem Versuch auf der rechten Seite (G-L) ist keine morphologische Veränderung zu erkennen.

In einem über 21 Tage geführten Versuch, bei dem die Anordnung der ASCs im bzw. auf Matrigel mit einer DAPI Färbung nachgewiesen wurde, wurde das Kontrollmedium DF 2% mit konditioniertem Medium verglichen. Es wurde deutlich, dass die mit kM versorgten Zellen stärker proliferierten und sich in charakteristischen Mustern anordneten, während die Zellen bei DF 2% willkürlicher vorlagen. Außerdem zeigen die Bilder, dass die ASC in verschiedenen Ebenen im Matrigel angeordnet sind.

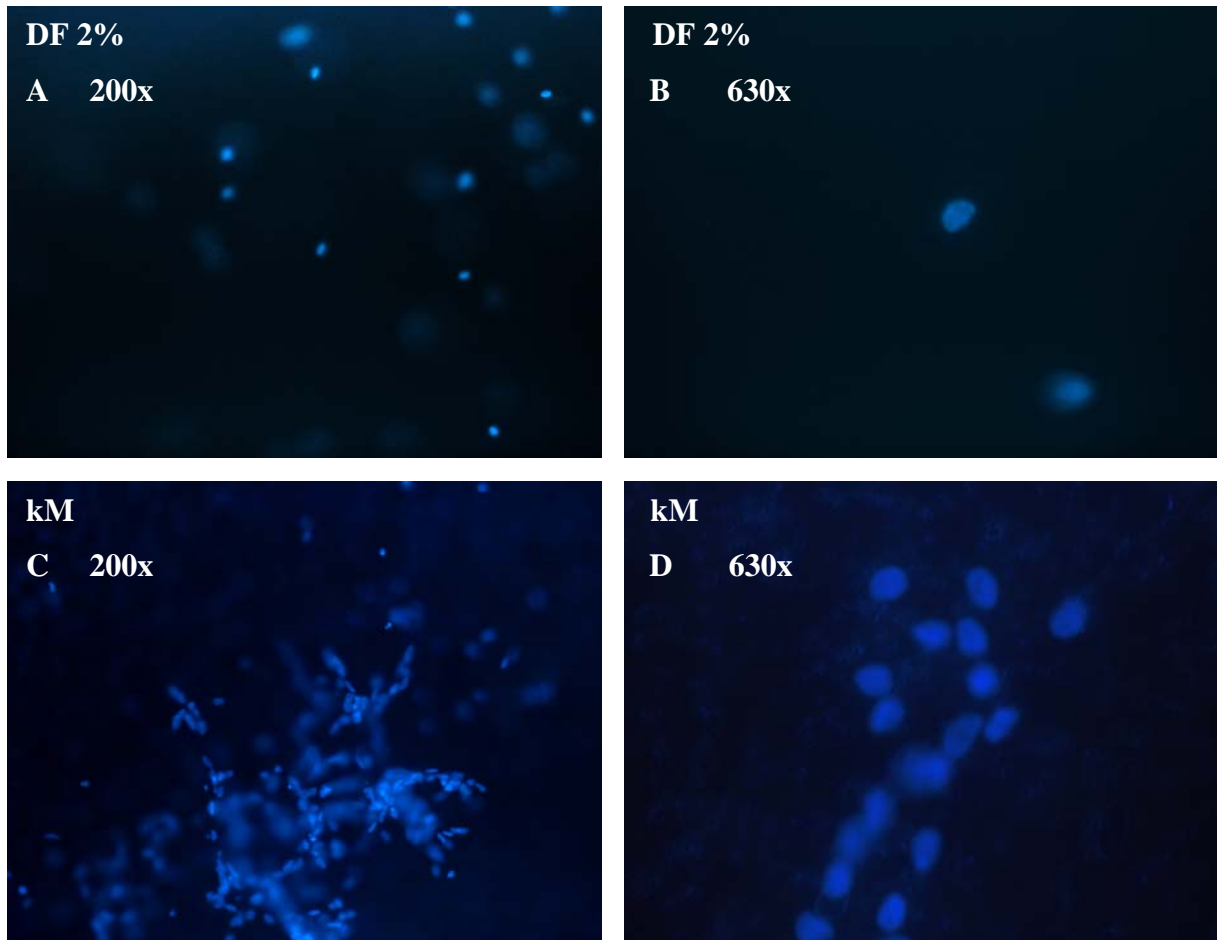


Abb. 34 DAPI Färbung von ASC auf Matrigel; die Abbildung zeigt die Anordnung der ASCs nach 21 Tagen Kultur auf Matrigel mit DF 2% oder kM in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen (200× und 630×).

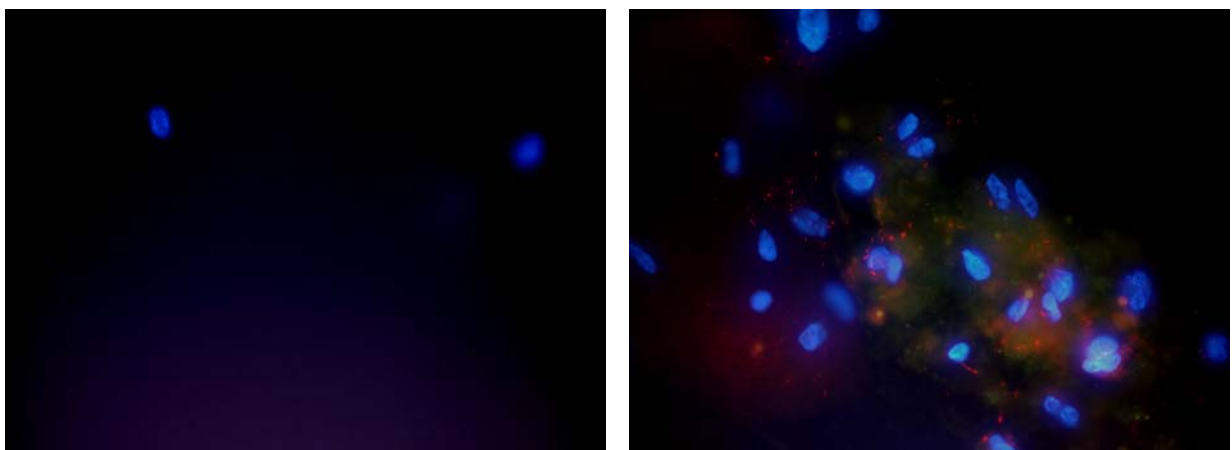


Abb. 35 ASC in Matrigel, Fluoreszenzfärbung; die Abbildung zeigt ASC, die für 21 Tage in Matrigel kultiviert wurden. Bild A zeigt mit DF 2% versorgte Zellen, während Bild B mit kM kultivierte Zellen zeigt. Die Kerne wurden mit DAPI blau gefärbt, ZO-1 wurde mit Cy3 gegengefärbt und ein Zytokeratin-FITC Antikörper wurde verwendet.

Um über die bloße Anordnung der Zellen hinaus weitere Informationen zum Differenzierungsstatus von ASC zu erhalten, wurden die Zellen nach 21 Tagen Kultur fixiert und zusätzlich zu DAPI mit ZO-1 (2.AK Cy3) und panCK-FITC gefärbt. In den meisten Fällen waren die ASC negativ für beide Marker. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass bei

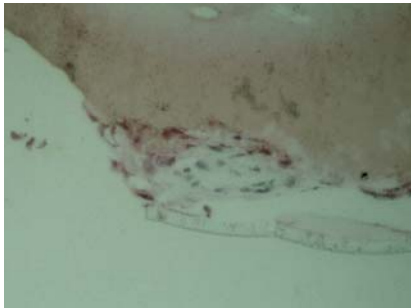


Abb. 36 *Hämatoxylin-Eosin-Färbung von ASC in Matrigel; die Abbildung zeigt die Zellkerne in blau/violett und das Cytoplasma in rosa.*

der Kultivierung mit konditioniertem Medium CK18 vorhanden war und eine ZO-1 Färbung an den Zellgrenzen erkennbar war.

Eine Einbettung der Zellen im oder auf Matrigel gestaltete sich schwierig, da das Matrigel sich während der Versuchsdurchführung auflöste. In einem Versuch konnte eine Probe eingebettet werden. Es wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Die Zellanordnung konnte aufgrund der wenigen Zellen, die in dem Schnitt nachgewiesen wurden, nicht genau festgelegt werden.

Im Western Blot wurden nach einer 14-tägigen Kultur mit Matrigel CK18 und ZO-1 nachgewiesen. Obwohl bei den auf oder in Matrigel kultivierten ASC eine deutliche Morphologische Veränderung zu erkennen war, konnte im Western Blot keine Veränderung der CK18 Expression festgestellt werden. Die ZO-1 Expression war im Vergleich zur Kontrolle sowohl bei der Beschichtung mit Collagen IV als auch mit Matrigel reduziert.

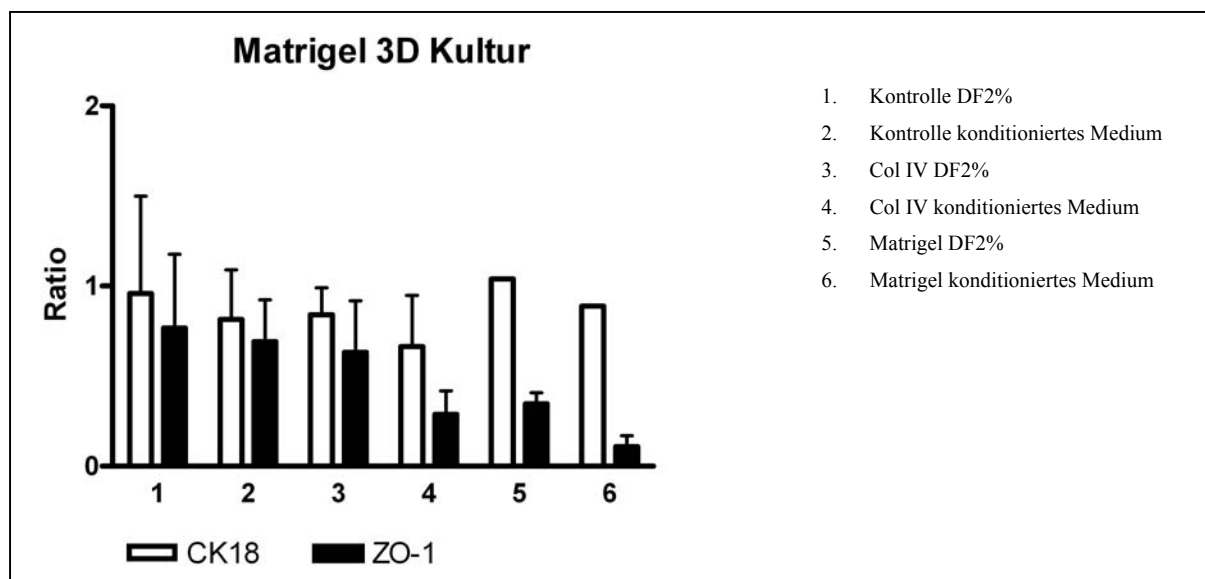


Abb. 37 *Kultur von ASC auf einer dicken Schicht Matrigel, Collagen IV oder Zellkulturplastik zur Kontrolle (Western Blot, densitometrische Auswertung); die Abbildung zeigt die CK18 und ZO-1 Expression nach 14 Tagen Kultur mit DF 2% oder konditioniertem Medium.*

Der Zusatz von Matrigel zum Medium beeinflusste die CK18 und ZO-1 Expression nur gering, während die Verwendung von konditioniertem Medium mit Matrigel die Expression beider Marker erhöhte. Collagen IV Zugabe verringerte die Expression der Marker geringfügig.

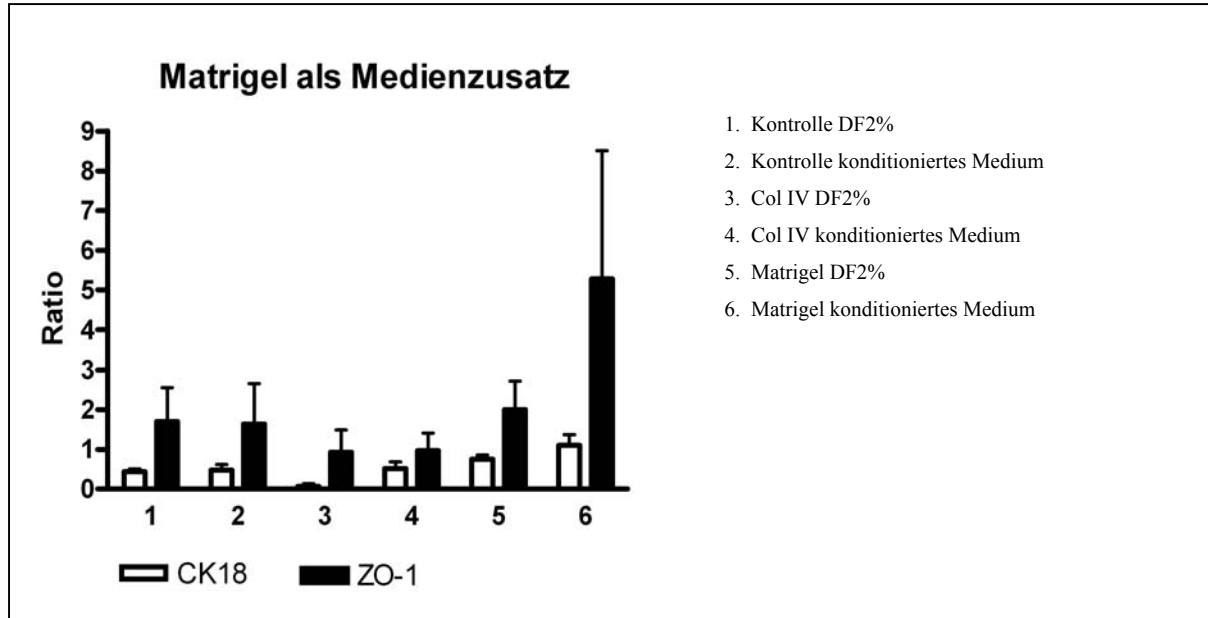


Abb. 38 Matrigel als Medienzusatz; Matrigel bzw. Col IV wurden dem Medium zugesetzt. Die Expression von CK18 und ZO-1 wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet.

Der Western Blot zeigt am Beispiel, dass der Einfluss von Matrigel durchaus die Expression von CK18 und ZO-1 erhöhen kann (1+2), wobei die Kultivierung mit konditioniertem Medium die Expression noch zu steigern scheint (2). Auch bei den Kontrollzellen auf Plastik konnte die Verwendung von konditioniertem Medium die Expression beider Marker erhöhen. Collagenase IV hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung.

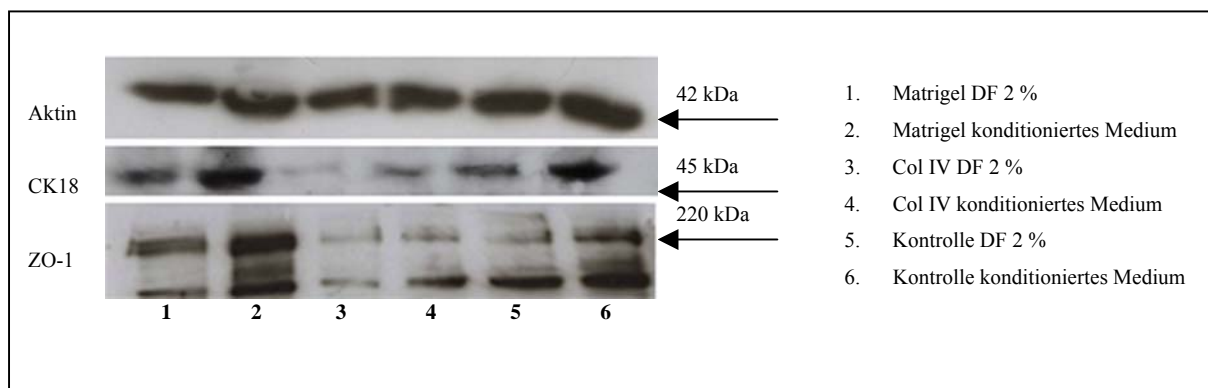


Abb. 39 Expression von CK18 und ZO-1 nach der Induktion mit Matrigel als Medienzusatz; ASC wurden mit Collagen IV oder Matrigel in DF Medium mit 2 % FKS oder konditioniertem Medium kultiviert. Als Kontrolle dienten DF 2 % und konditioniertes Medium ohne Medienzusatz.

Matrigel kann darüber hinaus auch in einer dünnen Schicht angewendet werden. Matrigel wurde bei diesen Versuchen in unterschiedlichen Konzentrationen (50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml und 500µg/ml) eingesetzt. Außerdem wurden Collagen IV (25µg/ml) und die Kulturgefäße ohne Beschichtung als Kontrolle mitgeführt. Bei der 14-tägigen Kultur mit DF 2% war die Expression von CK18 und ZO-1 bei den ASC höher, die in den beschichteten Kulturgefäßen ausgesät waren (Ausnahme 50µg/ml n=1). Ebenfalls erhöht war die Expression auch bei Collagen IV Beschichtung. Bei der Kultur mit DF 2% plus ATRA war die ZO-1 Expression kaum unterschiedlich und nur teilweise bei den niedrigeren Matrigelkonzentrationen und Col IV leicht erhöht. CK18 hingegen zeigte eine geringe Erhöhung bei einer Matrigelkonzentration von 200mg/ml und 500mg/ml. Die Anwendung von konditioniertem Medium brachte keine Erhöhung der Expression der epithelialen Marker hervor, sondern zeigte bei der CK18 Expression sogar eine Verringerung. Insgesamt waren

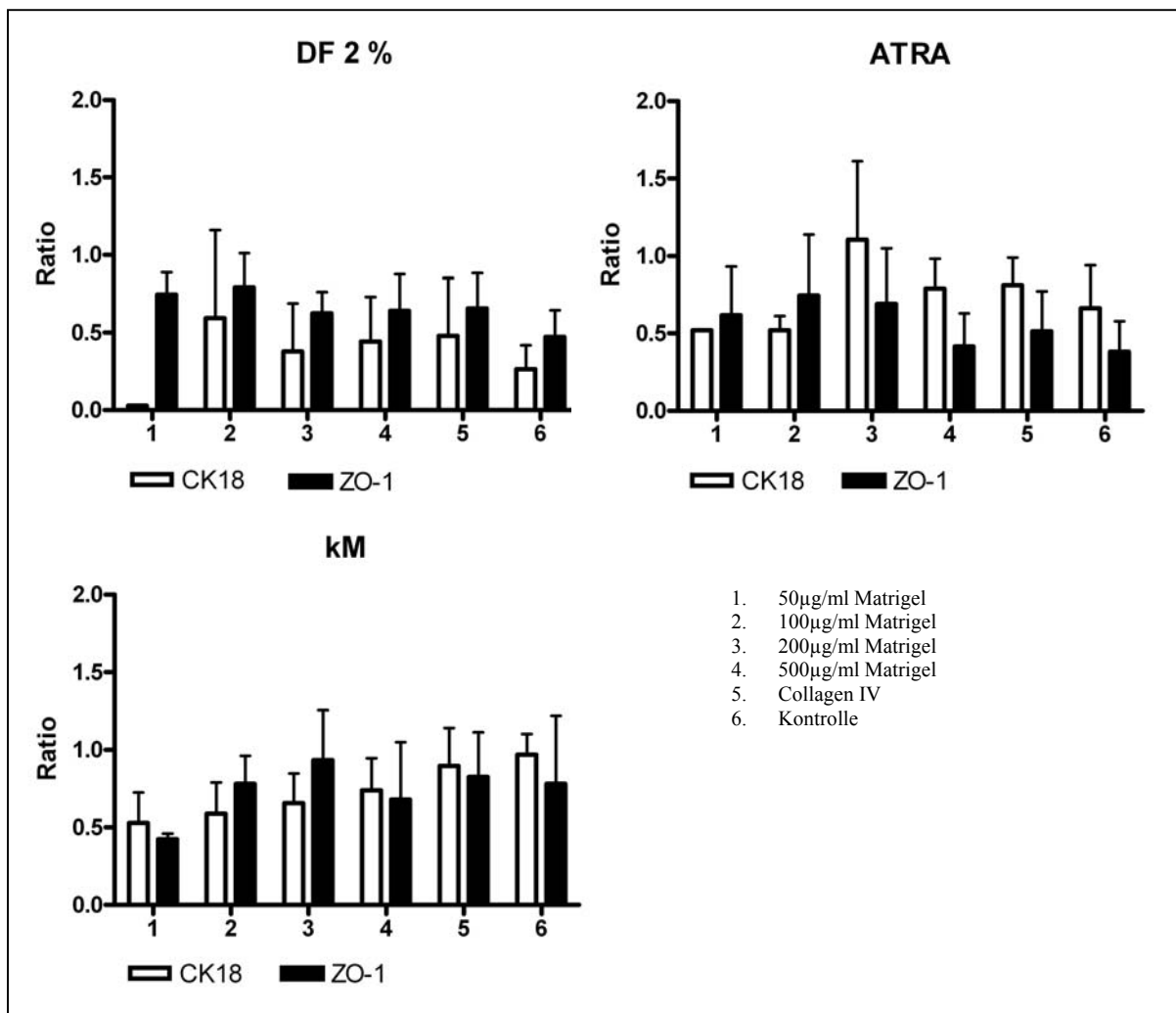


Abb. 40 Matrigel als dünne Beschichtung mit verschiedenen Konzentrationen und drei Medien (Western Blot, densitometrische Analyse); als Kontrolle wurde DMEM Medium plus 2% FKS verwendet. Außerdem wurden DF 2% mit ATRA und konditioniertes Medium verwendet.

die Abweichungen bei den Versuchen mit den unterschiedlichen Matrigelkonzentrationen nicht signifikant und es konnte keine Abhängigkeit von der eingesetzten Matrigelkonzentration nachgewiesen werden.

Für die Beschichtung mit verschiedenen Matrigel Konzentrationen wurde außerdem eine PCR durchgeführt, bei der CK18 und ZO-1 sowie zusätzlich ZO-2 untersucht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die drei epithelialen Marker unterschiedlich exprimiert wurden, je nach Beschichtung oder Medium. Bei allen drei Markern zeigte sich, dass Matrigel eine stärkere Expression bewirkte. Bei der Kontrolle und den mit Collagen IV beschichteten Proben wurden die Gene in geringem Maße ebenfalls exprimiert. Konditioniertes Medium induzierte

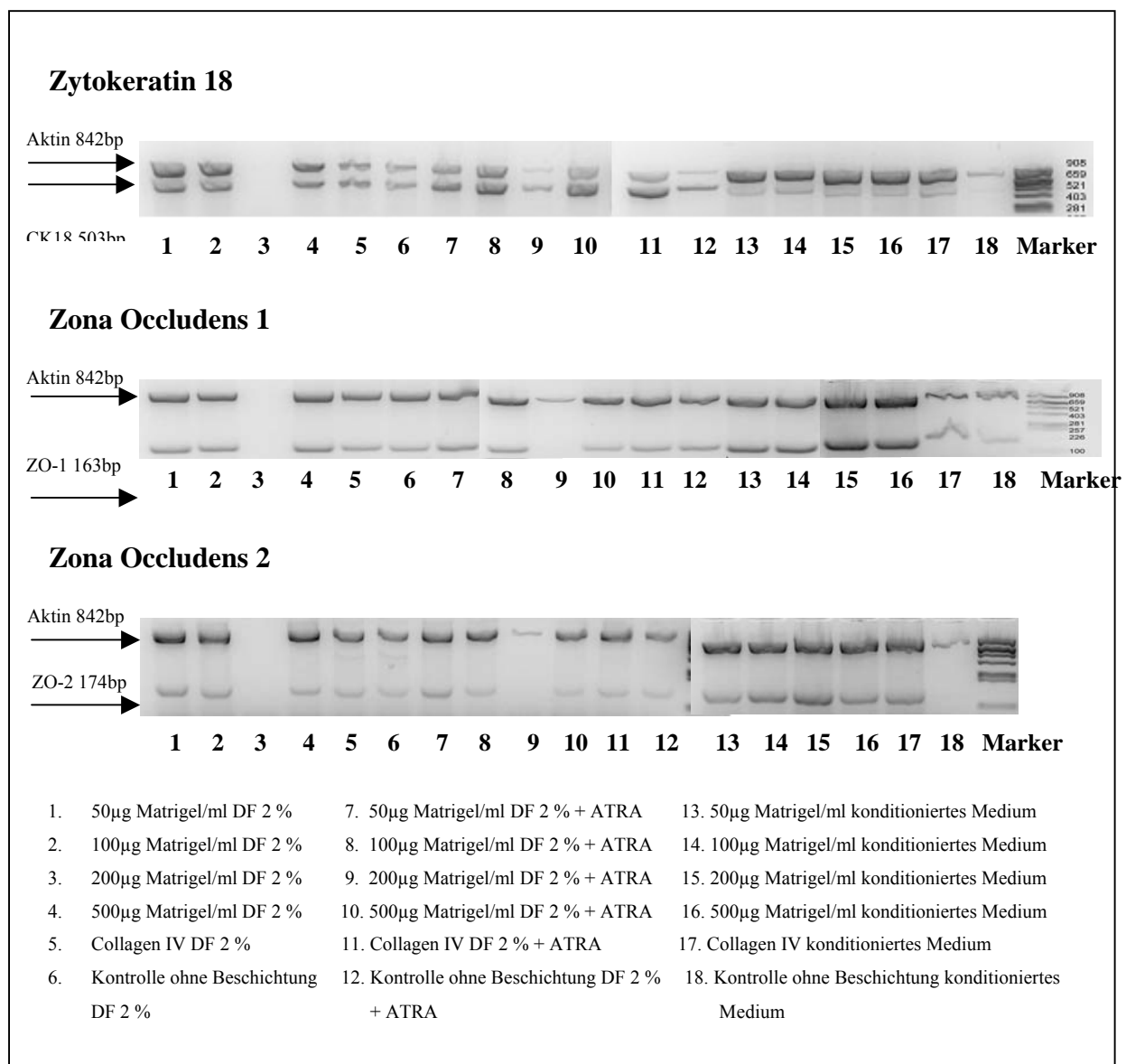


Abb. 41 PCR Ergebnisse von ASC nach 14-tägiger Kultivierung mit Matrigel und verschiedenen Medien; die Abbildung zeigt charakteristische PCR-Gele. ASC wurden auf einer dünnen Schicht Matrigel in unterschiedlicher Konzentration kultiviert. Außerdem wurden drei verschiedene Medien verwendet: 1) DF 2%, 2) DF 2% mit ATRA und 3) konditioniertes Medium (n=3).

im Gegensatz zu dem Kontrollmedium DF 2% eine deutlich erhöhte Expression von ZO-1, ZO-2 und CK18. Der Zusatz von ATRA verursachte keine markanten Unterschiede in der Expression.

3.3. Einfluss der Co-Kultur von Tubuluszellen und Stammzellen aus Fettgewebe

Für Co-Kultur Versuche von Tubuluszellen und ASC müssen die Zellen nach der Kultur bzw. während der Kultur voneinander unterscheidbar sein. Dies kann u. a. durch eine indirekte Co-Kultur mittels Membraneinsätzen gelöst werden. In diesem Fall werden die Zellen in einer 6-Loch oder 24-Loch Platte in dem gleichen Loch miteinander kultiviert, sind aber durch eine Membran voneinander getrennt und stehen dadurch nicht in direktem Kontakt miteinander. Durch die Poren der Membran können lösliche Stoffe bis zu einer bestimmten Größe, wie z.B. Wachstumsfaktoren, ausgetauscht werden. Es ist möglich, dass die löslichen Faktoren alleine keine oder nur eine eingeschränkte Wirkung auf die Differenzierung der ASC haben, da die Zellen auch direkte Zell-Zell-Kontakte benötigen, um differenzieren zu können. Für die direkte Co-Kultur müssen die Zellen entweder durch eine XY-chromosomale Selektion über Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) oder über eine Markierung einer der Zellarten auseinander gehalten werden. Die Markierung kann über eine Transfektion oder eine Färbung des Zytoplasmas erreicht werden. In dieser Arbeit wurden die Zellen mit einem CellTracker, der im Zytoplasma der Zelle nachweisbar ist, markiert. Außerdem wurde die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung getestet.

3.3.1. Indirekte Co-Kultur

Die indirekte Co-Kultur wurde mittels Membraneinsätzen, durch die die Zellen durch eine Membran mit einer Porengröße von 3µm von den in der Platte ausgesäten Zellen getrennt waren, durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss von primären Tubuluszellen und Nierengewebe auf die Differenzierung der ASC untersucht. Zusätzlich wurden dem Medium verschiedene Wachstumsfaktoren zugesetzt. Abbildung 42 zeigt ASC, die unter Tubuluszellen oder Nierengewebe, sowie dem Zusatz von EGF für 14 Tage kultiviert wurden. Die Zellen, die unter den Membraneinsätzen kultiviert wurden, zeigten eine deutliche morphologische Veränderung gegenüber den Kontrollzellen. Während die Kontrollzellen runder und flacher aussahen, waren die stimulierten Zellen schmaler und lang gestreckt. Die Zugabe des

Wachstumsfaktors EGF schien die Proliferation der Zellen zu erhöhen ohne aber die Morphologie der Zellen zu beeinflussen.

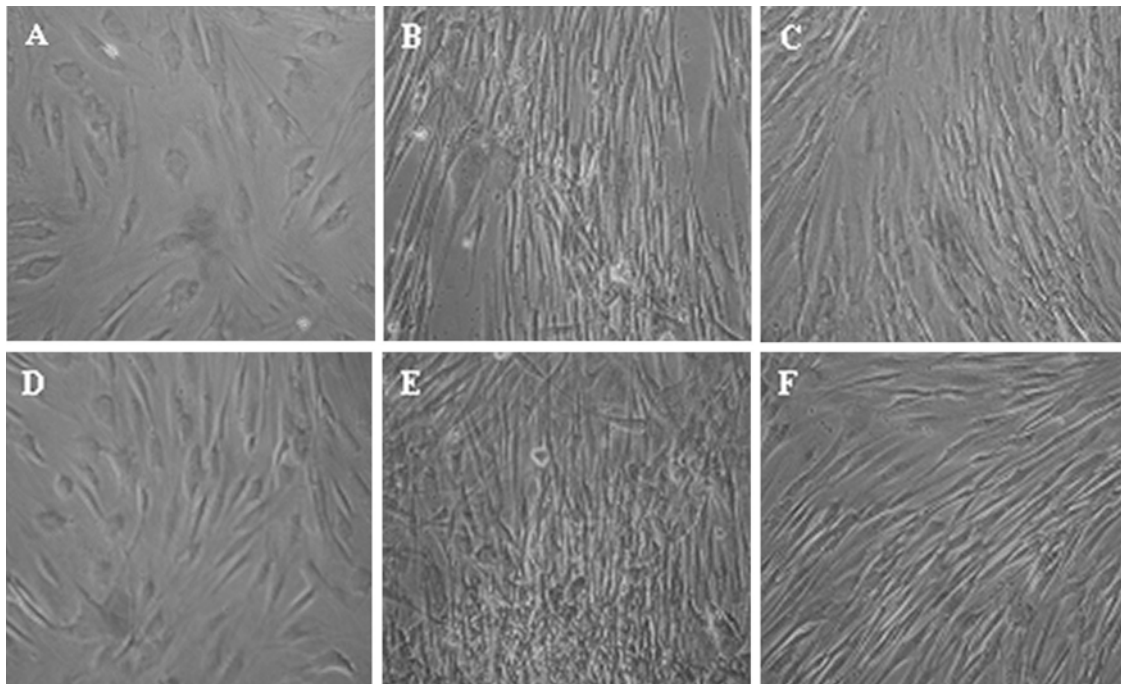


Abb. 42 Morphologie von ASC nach 14d indirekter Co-Kultur über Membraneinsätze mit Nierengewebe oder Tubuluszellen; die Bilder A-C zeigen mit DMEM Medium + 2% FKS kultivierte Zellen, während den Zellen bei den Abbildungen D-F zusätzlich noch für sieben Tage EGF zugesetzt wurde. A) ASC Kontrolle, B) ASC unter Nierengewebe, C) ASC unter Tubuluszellen, D) ASC Kontrolle + EGF, E) ASC unter Nierengewebe + EGF und F) ASC unter Tubuluszellen+ EGF.

Abbildung 43 zeigt am Beispiel das Ergebnis einer indirekten Co-Kultur mit Nierengewebe und Tubuluszellen. Die CK18 Expression der ASC wurde durch die indirekte CO-Kultur mit Nierengewebe erhöht. Die Zugabe von EGF zum Medium verringerte diesen Effekt wieder. Die ZO-1 Expression war unverändert im Vergleich zur Kontrolle (1, ASC). Ohne die Co-Kultur war die ZO-1 Expression nach der Zugabe von EGF zum Medium leicht erhöht. Die

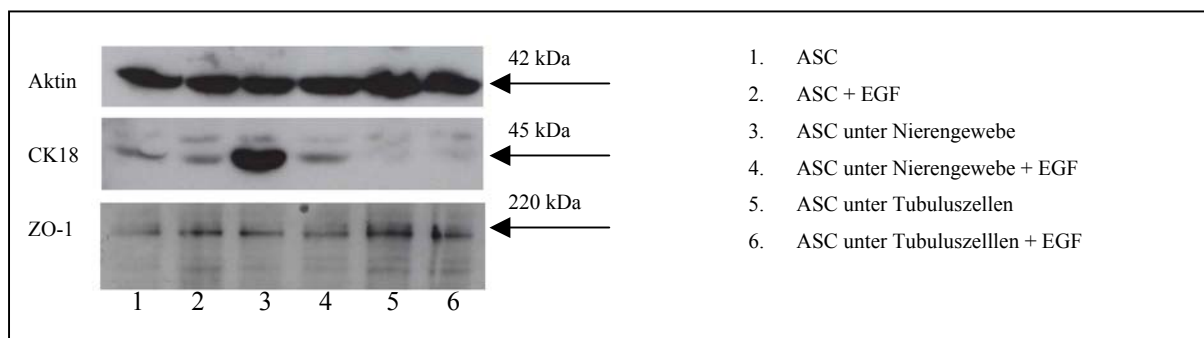


Abb. 43 Western Blot für die Co-Kultur mit Membraneinsätzen; es wird ein Beispiel für 14-tägige Kultur von ASC unter Membraneinsätzen und verschiedenen Medien gezeigt. Die indirekte Co-Kultur mit Nierengewebe erhöhte die CK18 Expression, die ZO-1 Expression aber nur leicht.

Co-Kultur mit Tubuluszellen zeigte in diesem Beispiel eine erhöhte ZO-1 Expression, aber kaum eine CK18 Expression.

Die densitometrische Auswertung der Western Blots zeigte aber keine statistisch signifikanten Änderungen in der Expression von CK18 oder ZO-1 bei ASC, die durch die indirekte Kultivierung von Tubuluszellen oder Nierengewebe in Membraneinsätzen hervorgerufen wurden. Bei dieser Versuchsreihe nahm die CK18 Expression bei der Co-Kultur mit Tubuluszellen sogar leicht ab, während die ZO-1 Expression geringfügig anstieg. Ein Einfluss des Nierengewebes auf die ASC konnte nicht bestätigt werden.

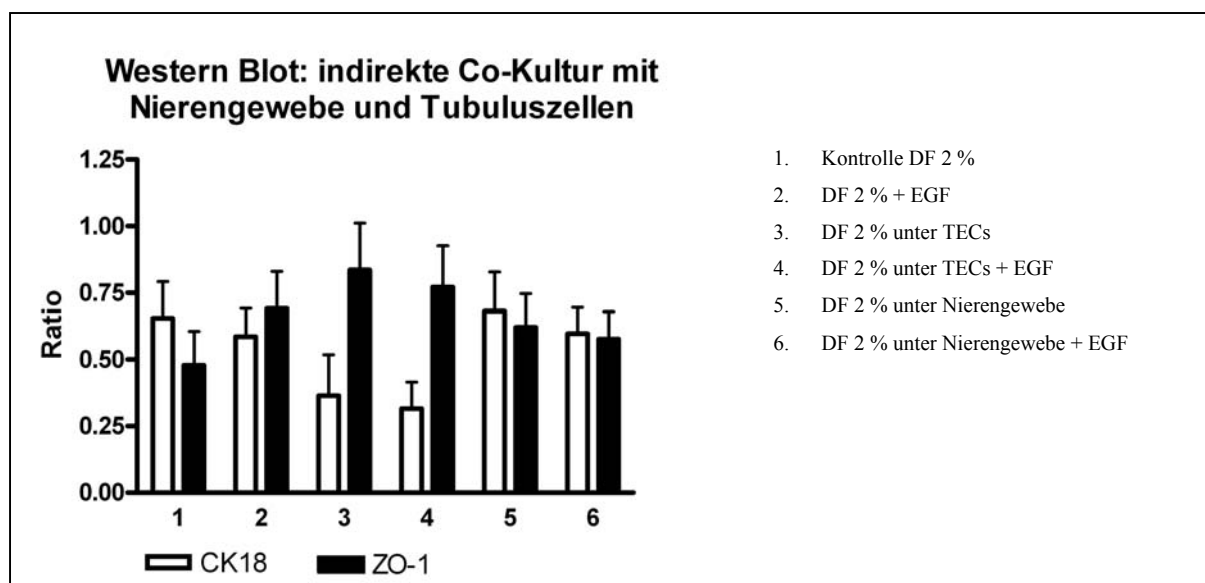


Abb. 44 Zytokeratin 18 und Zona Occludens 1 Expression in ASC bei der indirekten Co-Kultur mit Nierengewebe; die Abbildung zeigt eine densitometrische Analyse der Western Blots bei der Co-Kultur mittels Membraneinsatz von Tubuluszellen und Nierengewebe im Vergleich zu einer Kontrolle aus ASC. Zusätzlich wurde der Zusatz von EGF zum Medium untersucht (n=7).

Die indirekte Co-Kultur mit Tubuluszellen zeigte im Western Blot, dass die Kultivierung mit Membraneinsätzen mit Tubuluszellen nur bedingt Einfluss auf die Zytokeratin 18 Expression und damit auf die Differenzierung in epitheliale Zellen hatte. Die Zugabe von ATRA erhöhte die Expression deutlich. Andere Faktoren wie bFGF, bFGF und VEGF, sowie eine Kombination aus HGF, KGF, EGF und IGF-2 bewirkten nur eine geringe Erhöhung der Expression.

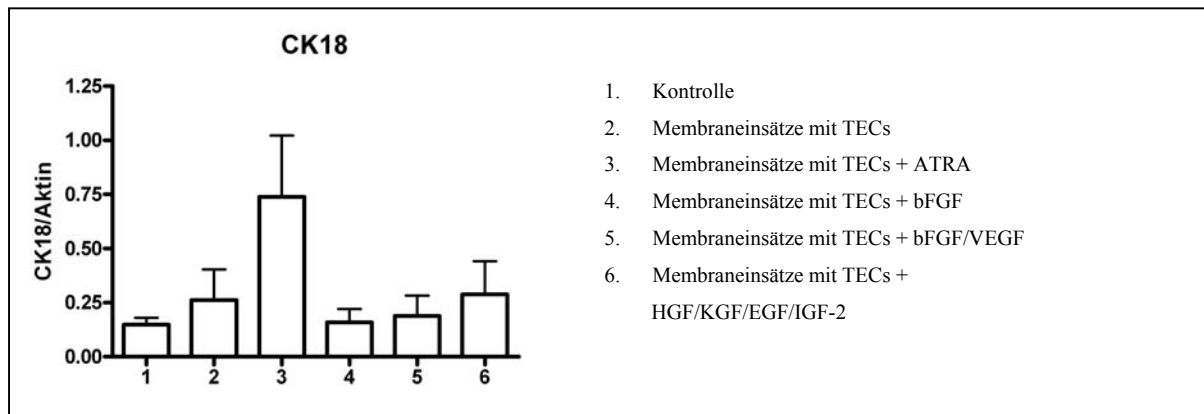


Abb. 45 Indirekte Co-Kultur von ASC und TEC; die Expression von Zytokeratin 18 von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren wurde im Western Blot miteinander verglichen (densitometrische Auswertung) ($n=3$).

Bei der indirekten Co-Kultur wurde außerdem noch ein Versuch durchgeführt, bei dem die Tubuluszellen mit H_2O_2 behandelt wurden, um eine Verletzung der Zellen herbeizuführen. ASC wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Sowohl die CK18 als auch die ZO-1 Expression blieben von der Co-Kultur mit H_2O_2 behandelten TEC unverändert. Die Zugabe von EGF zeigte ebenfalls keine Induzierung der epithelialen Marker. Eine leichte Erhöhung der CK18 Expression konnte bei der Co-Kultur mit Tubuluszellen gezeigt werden. ZO-1 blieb unverändert. Die Ergebnisse waren nicht signifikant.

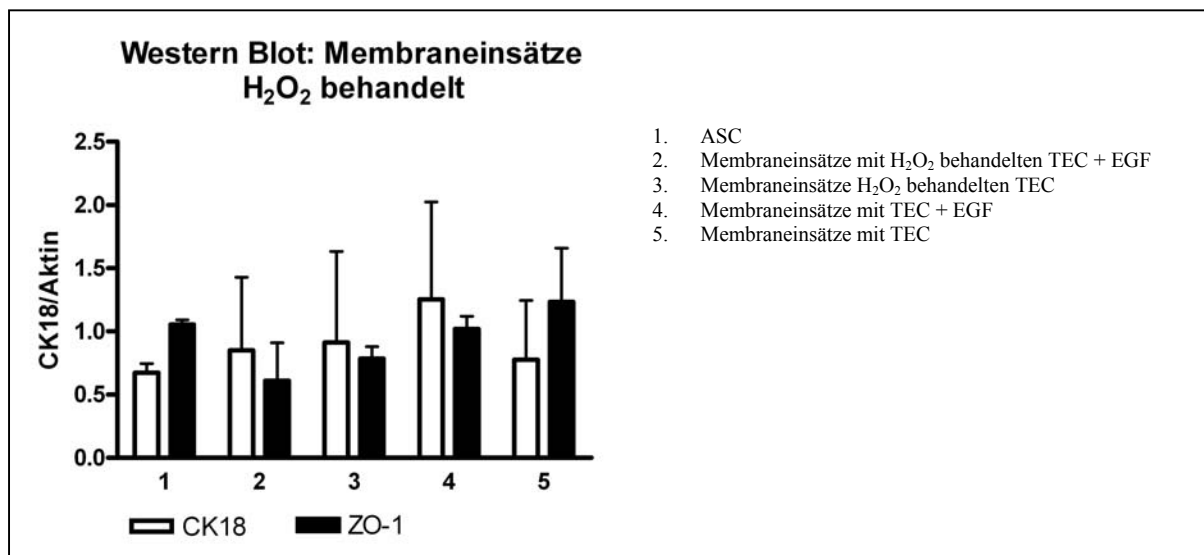


Abb. 46 Indirekte Co-Kultur mit H_2O_2 behandelten Tubuluszellen (densitometrische Analyse der Western Blots); TEC und ASC dienten als Kontrolle. Die Expression von CK18 und ZO-1 auf den ASC geht im Vergleich zur ASC Kontrolle zurück ($n=4$ für CK18; $n=2$ für ZO-1).

3.3.2 Direkte Co-Kultur

Die direkte Co-Kultur basiert auf der Theorie, dass der Zell-Zell-Kontakt wichtig für die Definition einer Zelle und somit auch der Differenzierung ist. Dabei war es notwendig, die Zellen zu jedem Zeitpunkt auseinanderhalten zu können. Zunächst wurde methodisch ermittelt, bei welchem Verfahren die Zellen am besten voneinander unterschieden werden konnten.

3.3.2.1. Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

Eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung wurde durchgeführt. Über Colcemid wurden die Tubuluszellen in die Metaphase gebracht und anschließend mit einer mit einem grünen Fluorophor (im FITC Spektrum messbar) markierten Sonde hybridisiert. Die Färbung der Y-Chromosome war deutlich zu erkennen. Eine punktuelle Färbung im Zellkern, der durch DAPI gefärbt wurde, konnte in den Zellen ausgemacht werden.



Abb. 47 Aufnahme einer Zelle nach der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung; gefärbt ist das Y-Chromosom mit einer grünen Sonde und die DNA im Kern mit DAPI (630x Vergrößerung mit Ölimmersion).

3.3.2.2 Evaluierung der einzusetzenden Menge an CellTracker green CMFDA

Um die ASC und die Tubuluszellen in der direkten Co-Kultur auseinander halten zu können, wurden die Tubuluszellen mit CellTracker green CMFDA gefärbt. Der CellTracker kann frei durch die Membran in die Zelle gelangen, wo er dann in ein Produkt umgewandelt wird, dass die Zelle nicht mehr verlassen kann. Dadurch kann der Marker nicht in anliegende Zellen gelangen. Der CellTracker ist über mehrere Generationen in der Zelle nachweisbar, nimmt aber an Intensität ab, da er während der Proliferation an die Tochterzellen weitergegeben wird. Untersuchungen zur Haltbarkeit und Nachweisbarkeit des CellTrackers in den Zellen haben ergeben, dass die Zellen nach etwa sieben Tagen schon deutlich weniger positiv für den Tracker waren als nach zwei Tagen.

Es wurden drei mögliche Konzentrationen des CellTrackers bezüglich ihrer Intensität, Länge der möglichen Detektion und der Proliferation getestet: 5 μ M, 10 μ M und 25 μ M. Dabei wurde ermittelt, dass die Intensität und Dauer der Markierung von der Konzentration abhängig waren, mit der die Zellen gefärbt wurden. Der Einsatz von 25 μ M CellTracker färbte die Zellen in einem Zeitraum von sieben Tagen am deutlichsten und die Nachweisbarkeit für diese Konzentration hielt länger an als für die beiden geringeren. Nach sieben Tagen war die Intensität des 5 μ M Ansatzes nur noch halb so stark wie die des 10 μ M Ansatzes.

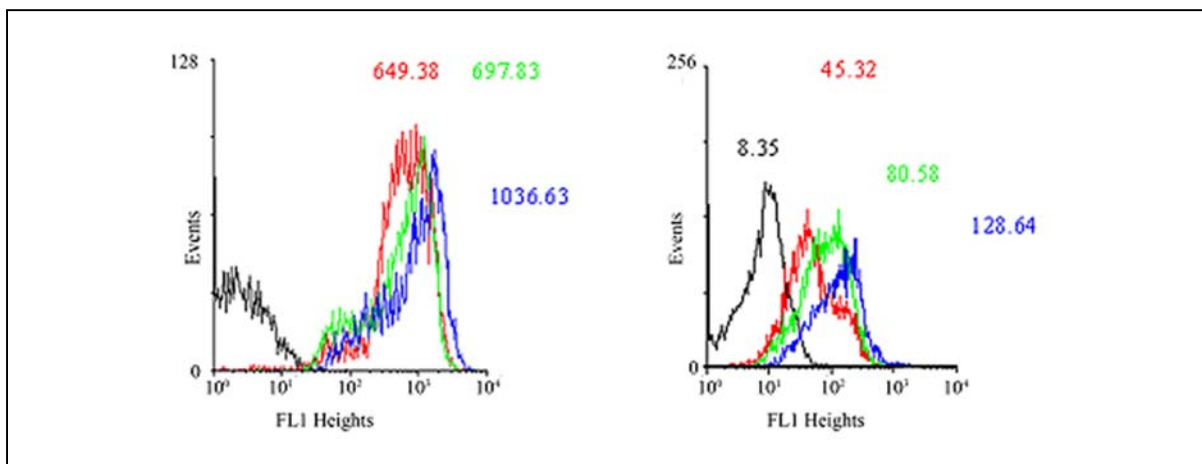


Abb. 48 Beispiel für die Intensität des CellTrackers green CMFDA nach 2d und 7d abhängig von der eingesetzten Konzentration des CellTrackers (5 μ M, 10 μ M und 25 μ M) in der Durchflusszytometrie; Bild A zeigt die mit verschiedenen Konzentrationen gefärbten Zellen nach 2d. Die einzelnen Peaks lagen weit von der Kontrolle getrennt und konnten leicht auseinander gehalten werden. Nach 7d lagen die gefärbten Zellen deutlich näher bei der ungefärbten Kontrolle und überschnitten sich teilweise. Je höher die Konzentration des CellTrackers war, desto höher war auch die Fluoreszenz nach 7d.

Zusätzlich wurde die Proliferation der mit CellTracker markierten Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Konzentration des CellTrackers proportional einen Einfluss auf die Proliferation nahm. Je höher der CellTracker konzentriert war, desto weniger proliferierten die Zellen.

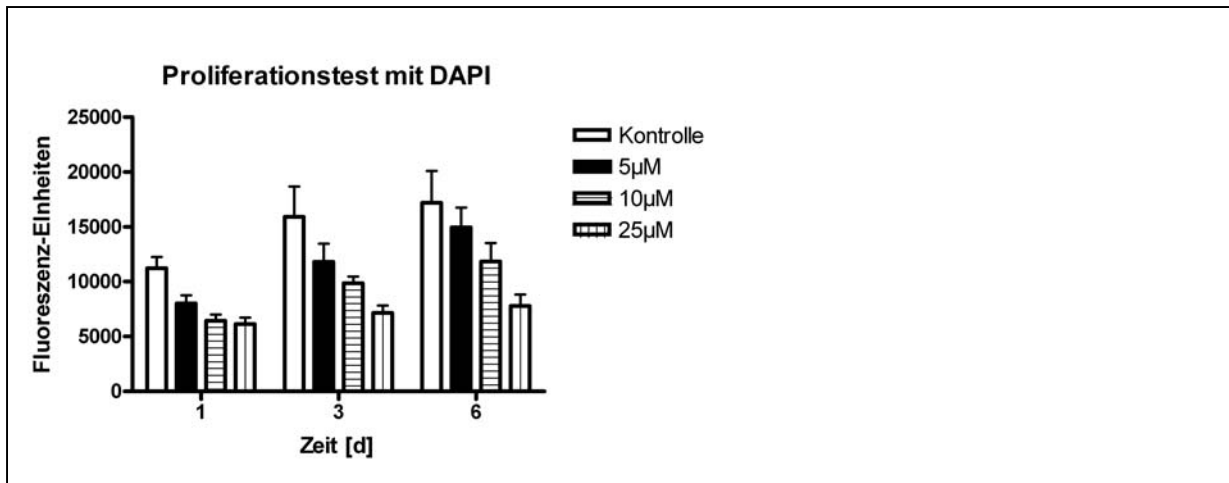


Abb. 49 Proliferation der mit CellTracker green CMFDA markierte Tubuluszellen nach 1, 3 und 6 Tagen; die Abbildung zeigt den Proliferationstest mit DAPI (n=5).

In der Immunfluoreszenz konnte der CellTracker gut nachgewiesen werden. Die Aufnahmen zeigen Tubuluszellen, die mit CellTracker markiert wurden, nach zwei Tagen Kultur. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die markierten Tubuluszellen trotz der Behandlung mit dem CellTracker Zytokeratin exprimierten.

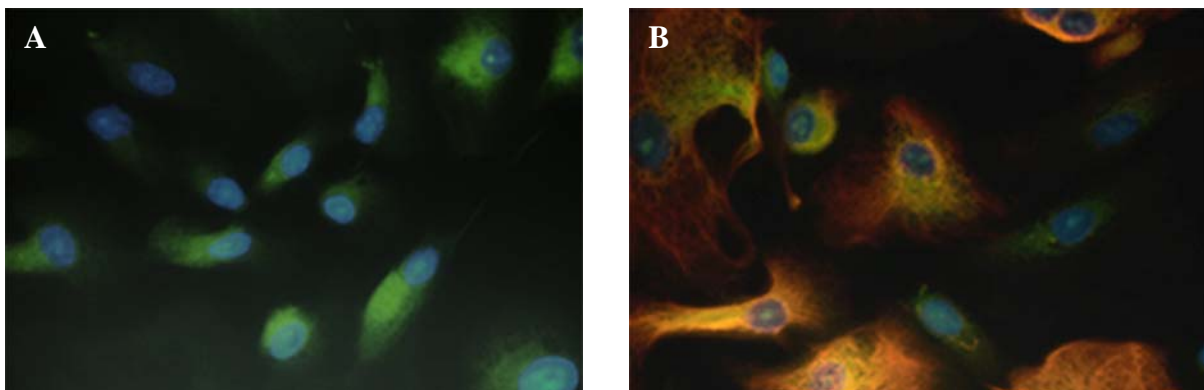


Abb. 50 Fluoreszenzaufnahmen von markierten Tubuluszellen; die Abbildung zeigt mit CellTracker markierte Tubuluszellen. DAPI diente zur Anfärbung der Zellkerne. Bild A) zeigt mit CellTracker green CMFDA markierte Zellen und Bild B) zusätzlich die Färbung mit pan Zytokeratin (Vergrößerung: 630x).

3.3.2.2 Direkte Co-Kultur mit CellTracker

Für die Kurzzeitversuche wurde die Co-Kultur für vier Tage durchgeführt. Die Analyse erfolgte über die Durchflusszytometrie und über Immunfluoreszenztests.

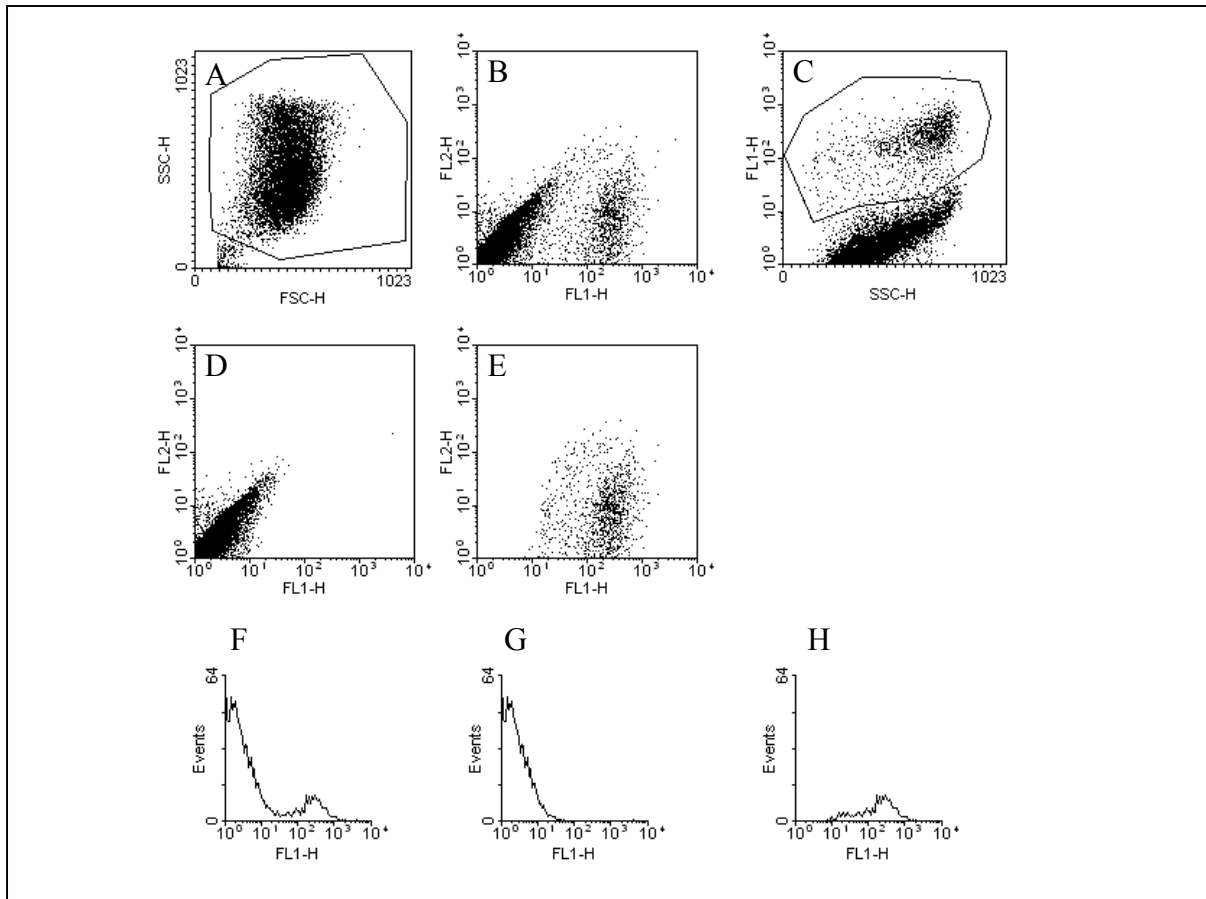


Abb. 51 FACS Analyse von Co-Kulturen mit grün markierten Tubuluszellen (CMFDA CellTracker) und Stammzellen aus Fettgewebe nach 4d; die Bilder zeigen die Gates, die zur Trennung der Zellen angewendet wurden in einem Dotplot (Punktauftragung) sowie im Histogramm. Bild A zeigt die Zellen im forward (FSC) und sideward scatter (SSC), wo eine Region R1 die relevanten Zellen einschließt. Dadurch wurden tote Zellen und Zelldebris ausgeschlossen, die in Bild B, welches die Fluoreszenzen FL1 (FITC Kanal) und FL2 (PE Kanal) gegeneinander zeigt, damit ausgegrenzt wurden (and R1). In Bild B sind zwei deutliche Populationen erkennbar, wovon eine positiv für FL1 war. Bild C stellt den SSC gegenüber FL1 dar und schließt nur die lebendigen Zellen ein. Eine zweite Region R2 wurde erstellt, in der die FL1 positiven Zellen eingeschlossen waren. Die Bilder D und E zeigen wieder die Fluoreszenzen gegeneinander mit der Verwendung unterschiedlicher Regionen. Während Bild D R2 ausschließt, somit also nur die FL1 negativen Zellen zeigt, schließt Bild E die positiven Zellen ein und die negativen aus. Als letztes sind Histogramme des gleichen Versuchs zu sehen und zum Vergleich unterschiedlich gated: F) R1, G) R1 and not R2 und H) R1 and R2.

In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von ATRA, Aktivin A und BMP-7 die CD90 Expression verringerte und die CK18 Expression erhöhte, wenn die ASC mit den Tubuluszellen in einer Co-Kultur kultiviert wurden. Bei den Immunfluoresznztest konnte kein eindeutiges Ergebnis bestimmt werden, da die Zellen übereinanderwuchsen und so nicht mehr auseinandergehalten werden konnte. Die Zellen

waren fast ausschließlich Zytokeratin positiv, aber die CellTracker gefärbten TEC konnten nicht von den ASC unterschieden werden.

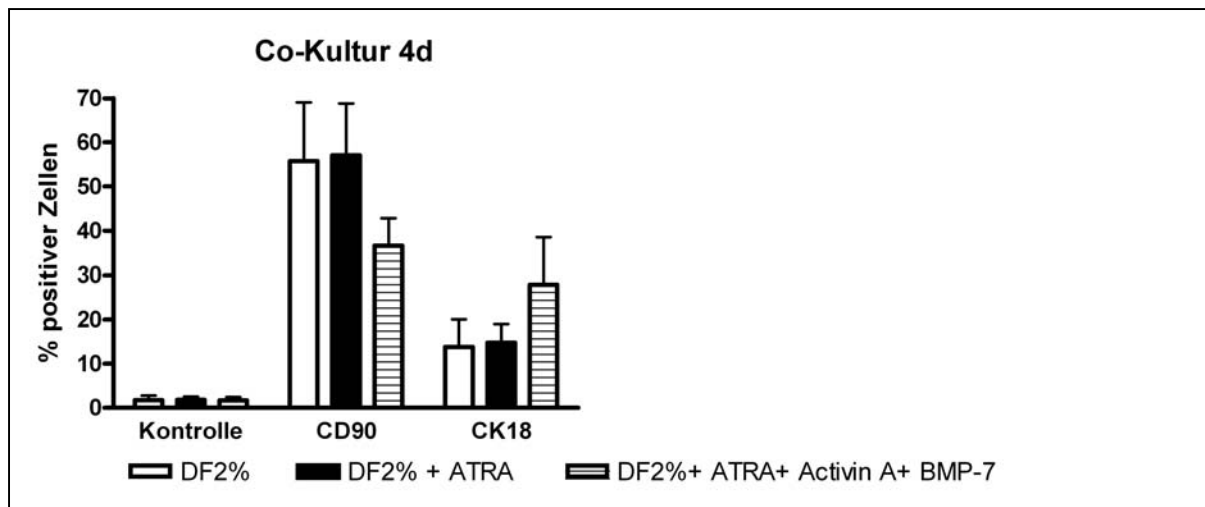


Abb. 52 Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach 4 Tagen Co-Kultur; die Abbildung zeigt die Expression von CD90 und Zytokeratin 18 von ASC nach vier Tagen Co-Kultur mit CellTracker markierten Tubuluszellen. Es wurden drei verschiedene Medien verwendet: 1. DMEM + 2 % FKS als Standardmedium, 2. das Standardmedium plus ATRA und 3. das Standardmedium plus ATRA, Aktivin A und BMP-7 (n=4) (densitometrische Auswertung).

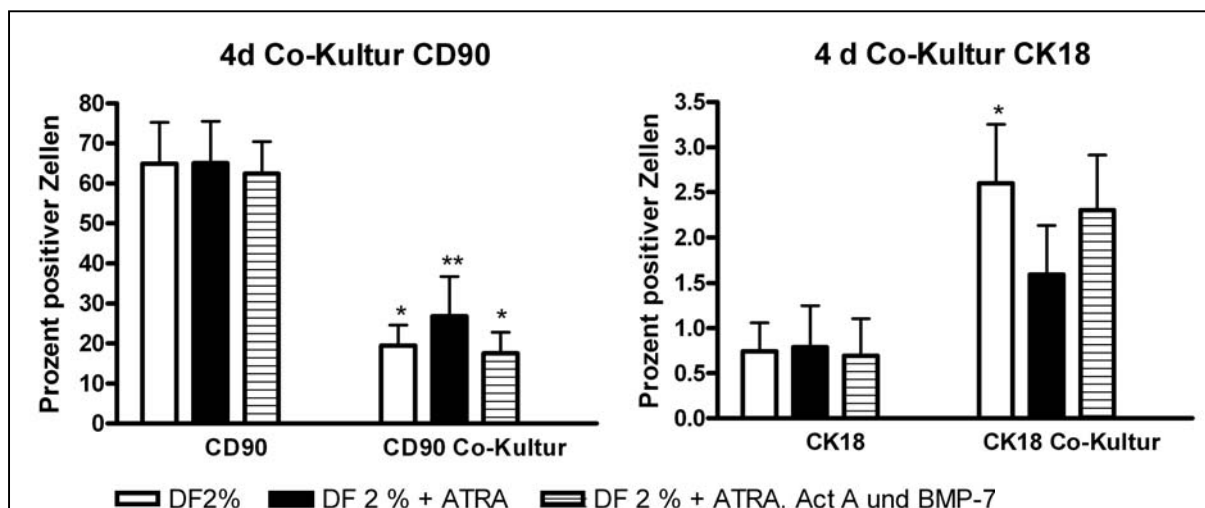


Abb. 53 Direkte Co-Kultur nach 4d Kultur; in der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD90 durch die Co-Kultur sank, während der epitheliale Marker CK18 stieg. Die unterschiedlichen Medien beeinflussten die Expression beider Marker kaum (n=3) (* = statistisch signifikant (p-Werte < 0,05); ** = statistisch hochsignifikant (p-Werte < 0,01)).

Die Kurzzeitversuche wurden mit DMEM plus 2% FKS als Kontrolle und mit den Zusätzen ATRA, sowie der Kombination aus ATRA, Aktivin A und BMP-7 durchgeführt. Die Versuche in der Co-Kultur wurden außerdem mit auf unmodifizierter Plastik kultivierten ASC

durchgeführt, um den Einfluss der Co-Kultur im Vergleich zu dem der Medienzusätze einschätzen zu können. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Co-Kultur stärker als der der Faktoren alleine war. Die Zugabe von Faktoren konnte diesen Effekt jedoch noch verstärken.

Des Weiteren wurden diese Versuche auch nach sieben Tagen durchgeführt. Der CellTracker war nach sieben Tagen schon deutlich weniger fluoreszierend, konnte aber von den nicht markierten Zellen unterschieden werden. Die CD90 Expression war nach sieben Tagen ebenfalls hochsignifikant reduziert. Die Unterschiede zwischen den verwendeten Medien waren dabei nur gering. Die Expression von CK18 war durch die Co-Kultur erhöht, wobei DF 2% den stärksten Einfluss hatte. Die Erhöhung war allerdings nicht, wie nach vier Tagen, signifikant.

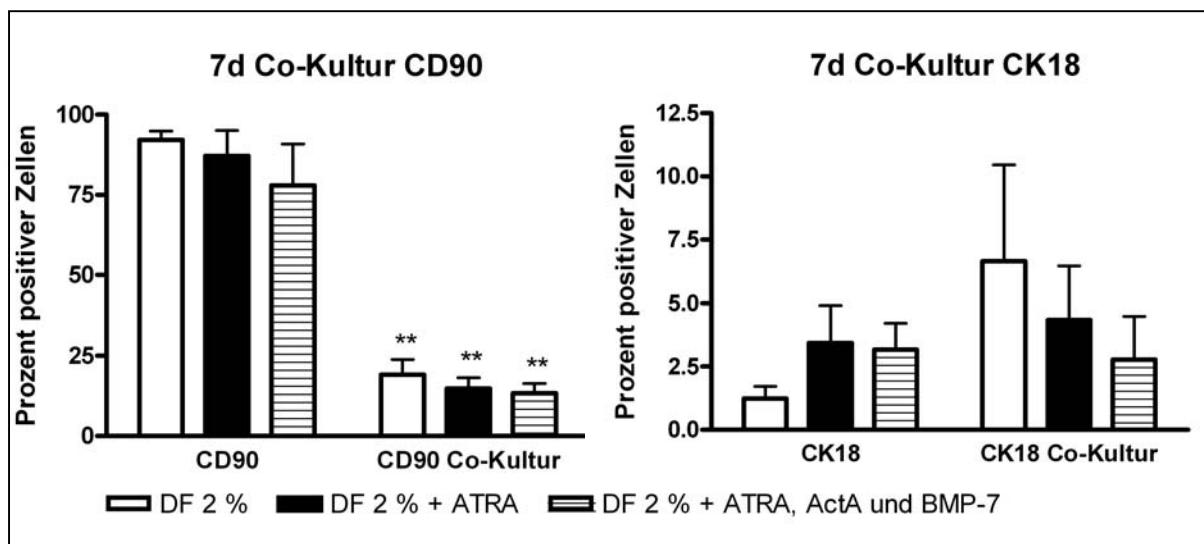


Abb. 54 Direkte Co-Kultur nach 7d Kultur (Durchflusszytometrie); die CD90 Expression wurde durch die direkte Co-Kultur hochsignifikant reduziert. Die Expression von CK18 war leicht erhöht ($n=3$) (* = statistisch signifikant (p -Werte $<0,05$); ** = statistisch hochsignifikant (p -Werte $<0,01$)).

3.3.2.3 Fixierung der mit CellTracker markierten Zellen

Da die Differenzierung von Zellen oft erst nach einiger Zeit initialisiert wird, sollte der CellTracker für Langzeitversuche mindestens 14 Tage nachweisbar sein. Der Farbstoff selbst verliert nicht an Intensität, sondern wird durch die Weitergabe an Tochterzellen ausgedünnt. Deshalb wurde eine Inhibierung der Proliferation der markierten Zellen in Erwägung gezogen, Dabei wurden zwei Methoden angewendet. Zum einen wurden die Zellen nach der Färbung mit dem CellTracker mit 30Gy bestrahlt und zum anderen wurde eine Fixierung mit

Paraformaldehyd (PFA) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 2x mit NaCl gewaschen und anschließend 1h bei Raumtemperatur mit 1% PFA fixiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen, um die Reste des PFAs zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in DF 10% kultiviert und die unmarkierten Zellen wurden am selben Tag hinzugefügt.

Versuche zur Fixierung der Zellen mit PFA über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen haben ergeben, dass die Zellen am Anfang noch keine signifikanten Unterschiede in der Intensität des CellTrackers zeigten. Nach 14 Tagen zeigten sich dann signifikante Unterschiede zwischen den fixierten und nicht fixierten Zellen. Während der Prozentanteil der gefärbten fixierten Zellen unverändert hoch war, sank der Anteil bei den nicht fixierten Zellen auf $56,92 \pm 22,90$

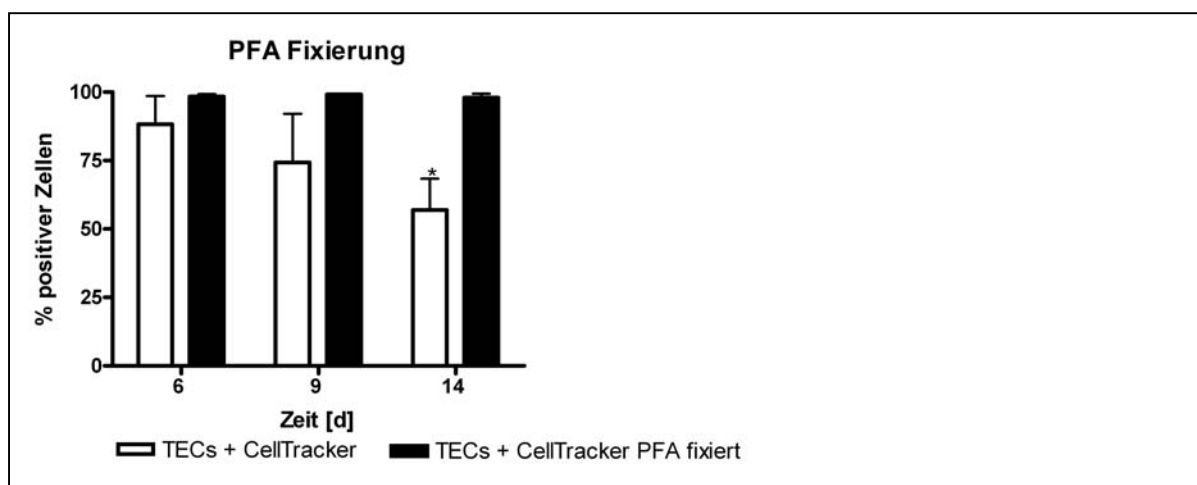


Abb. 55 Verlauf der CellTracker Intensität über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen in TEC nach der Fixierung mit PFA (Durchflusszytometrie); nach 14d ist der Anteil der positiven Zellen in nicht fixierten Zellen hochsignifikant reduziert ($n=4$).

Tab. 11 CellTracker markierte Tubuluszellen nach 6, 9 und 14 Tagen Kultur ($n=4$)

					Mittelwert \pm SD
6d CellTracker	98,79	57,6	97,77	98,99	88,29 \pm 20,47
9d CellTracker	96,01	21,62	84,33	95,13	74,27 \pm 35,50
14d CellTracker	73,82	23,63	60,38	69,84	56,92 \pm 22,90
6d CellTracker PFA fixiert	99,68	96,17	97,67	99,91	98,36 \pm 1,77
9d CellTracker PFA fixiert	98,97	98,84	98,86	99,96	99,16 \pm 0,54
14d CellTracker PFA fixiert	99,78	93,59	98,78	99,72	97,97 \pm 2,95

3.4. Untersuchungen zur Reduzierung der Heterogenität von Stammzellen aus Fettgewebe

ASC sind eine heterogene Mischung verschiedener Zelltypen und enthalten unter anderem mesenchymale, endotheliale und glattmuskuläre Zellen sowie Perizyten [Zuk et al., 2001]. Zur Charakterisierung wird mangels eines einzelnen eindeutigen Markers ein Panel an Oberflächenmarkern herangezogen. Einige Marker wurden auch im Rahmen dieser Arbeit zur Charakterisierung von ASC in der Durchflusszytometrie untersucht. Dazu gehörten CD10, CD13, CD26, CD29, CD44, CD49a, CD73, CD90, CD105 und CD166. Charakteristisch für ASC ist außerdem das Fehlen hämatopoetischer Antigene wie CD31, CD34 und CD45. Abbildung 56 zeigt exemplarisch in Histogrammen die oben genannten positiven Marker. Dabei zeigte sich, dass die Expression der Marker zwischen den verschiedenen Isolationen schwankte.

Um die Heterogenität der Stammzellen aus Fettgewebe zu reduzieren wurden zwei Ansätze untersucht. Zunächst wurden die Zellen mit der Standardmethode aus Liposuktionsaspirat isoliert, dann wurden die Zellen für den einen Versuch normal in einem Kulturgefäß ausgesät. Im Unterschied zu der Standardmethode, bei der das Medium der Zellen nach ein bis zwei Tagen gewechselt wurde, wurden die Zellen aber bereits nach einer Stunde zweimal mit NaCl gut gewaschen und anschließend normal weiterkultiviert. Der zweite Ansatz zur Reduktion der Heterogenität bestand in der Anwendung einer immunomagnetischen Isolation. Mittels Antikörpern und gekoppelter magnetischer Beads wurden Zellen, die bestimmte Marker exprimierten, isoliert. Als Marker wurden CD49a, CD90, CD105 und CD271 verwendet.

Um die Unterschiede der nach den verschiedenen Methoden isolierten Zellen zu ermitteln, wurde ein Panel an typischen Markern für ASC in der Durchflusszytometrie untersucht, (CD29, CD44, CD49a, CD73, CD90, CD105 und CD166). Außerdem wurden CD31, CD34, CD146, smA und Desmin überprüft. Des Weiteren wurde ein Vergleich der Marker in verschiedenen Passagen durchgeführt, da sich einige der typischen Marker über die Zeit in der Kultur verändern.

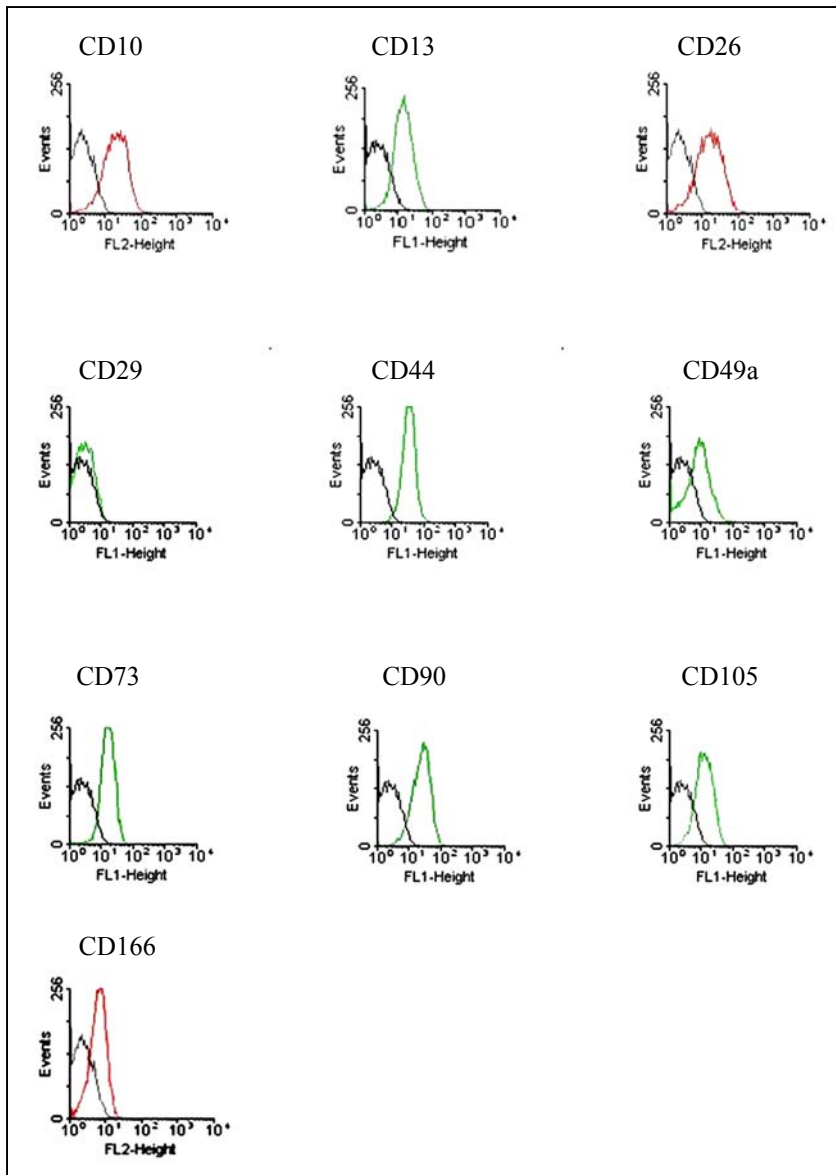


Abb. 56 Charakteristische Muster von Oberflächenmarkern von ASC; die Abbildung zeigt Histogramme der Marker CD10, CD13, CD26, CD29, CD44, CD49a, CD73, CD90, CD105 und CD166 aus der durchflusszytometrischen Analyse. Das schwarze Histogramm zeigt die nicht gefärbten Zellen, während die roten (PE) und grünen (FITC) Kurven die jeweiligen Marker darstellen.

In der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die ASC unterschiedliche Zelltypen enthielten, die smA, Desmin oder beide Filamente exprimierten (Abb.57). Eine Auszählung der Desmin bzw. smA positiven Zellen zum Vergleich zwischen den Isolationsmethoden war aufgrund der geringen Anzahl der positiven Zellen, besonders für die deutlich geringere Expression des Desmins, nicht statistisch auswertbar. Die Immunfluoreszenzbilder zeigen aber deutlich, dass in den ASC ein Teil der Zellen smA positiv ist, ein kleinerer Teil Desmin positiv oder doppelt positiv für beide Marker war.

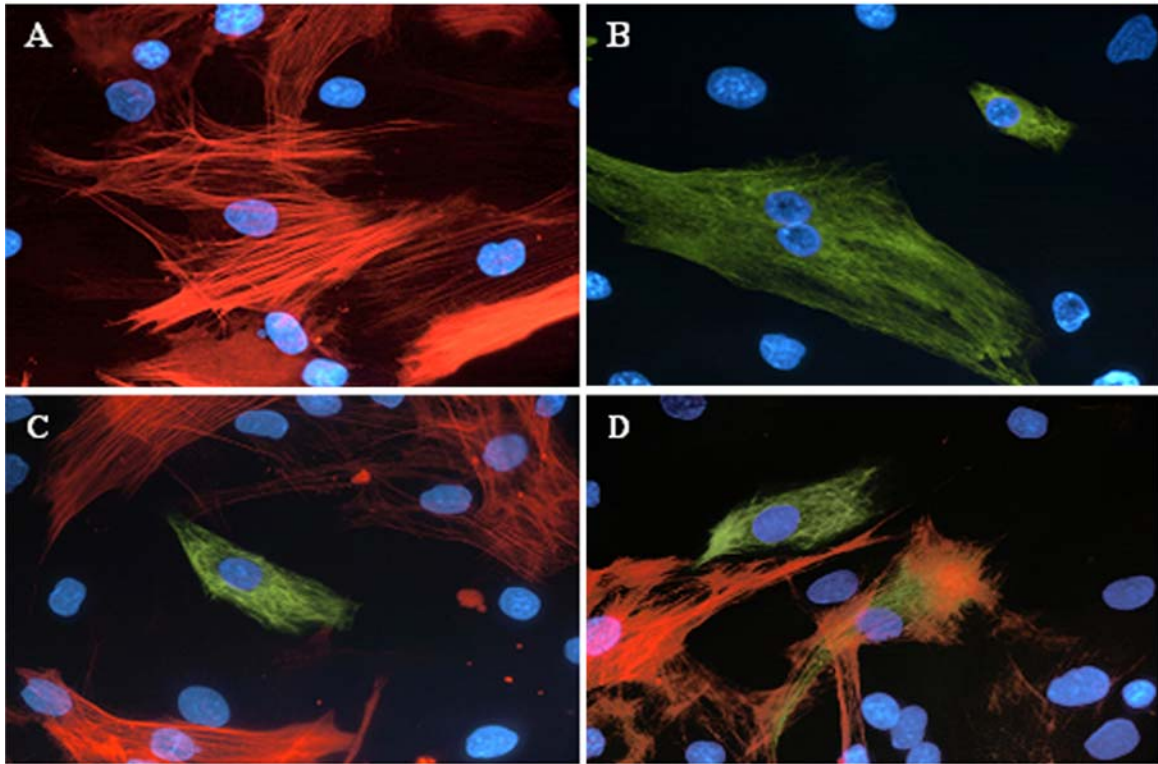


Abb. 57 Immunfluoreszenzfärbung von smA (rot) und Desmin (grün); DAPI (blau) diente zur Färbung der DNA in den Zellkernen. Die Abbildungen zeigen ASC, die nach der Standardmethode isoliert wurden, verschieden gefärbt. Abbildung A) zeigt ASC, die mit smA-Cy3 gefärbt wurden während Abbildung B) mit Desmin-FITC gefärbte ASC darstellt. Die Abbildungen C) und D) zeigen die Doppelfärbung von smA und Desmin, dabei sind ASC teilweise jeweils für eines der beiden Filamente positiv, teilweise aber auch doppelt positiv.

Auf der RNA Ebene wurde die relative Expression von Nestin, oct4, sall1, six2, smA und Desmin durch qPCR ermittelt. Zusätzlich wurde die Fähigkeit der Zellen zur Differenzierung in adipogene und osteogene Zellen, induziert durch bestimmte Medienzusätze, über eine Oil-Red-O und eine Van Kossa Färbung nachgewiesen.

Die Durchflusszytometrie hat gezeigt, dass die analysierten Marker in den gewaschenen Zellen gegenüber den nach der Standardmethode isolierten Zellen ein leicht verändertes Profil zeigen, wobei Unterschiede zwischen der frühen Passage (p2) und der späten Passage (p6) auftraten. Während CD73 in der 2. Passage nur sehr gering exprimiert wurde, stieg die Expression in der 6. Passage um fast das doppelte an. Auch CD166 war in den gewaschenen Zellen in der 6. Passage erhöht. Im Vergleich der Marker bezogen auf die Unterschiede, die ein zusätzlicher Waschschrift hervorbringt, war nur in der 6. Passage die Expression von CD73, CD90, CD105 und CD166 etwas erhöht. Mit der Durchflusszytometrie konnte keine signifikante Änderung ermittelt werden.

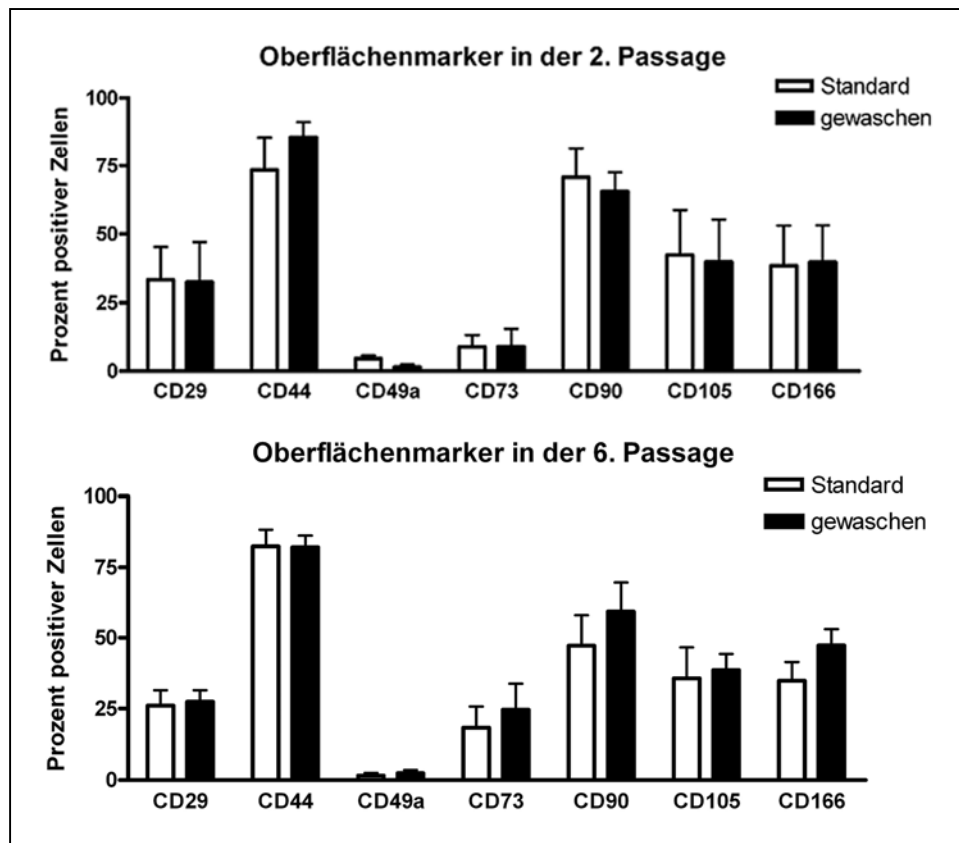


Abb. 58 Expression von Oberflächenmarker auf ASC. Vergleich zwischen den nach der Standardmethode isolierten und den nach 1h gewaschenen ASC einer frühen (p2, n=4) und einer späten Passage (p6, n=6) in der Durchflusszytometrie. Die Expression war nicht statistisch signifikant. In der 6. Passage sind die typischen Marker CD73 und CD166 höher exprimiert als in der 2. Passage.

Die Analyse zusätzlicher Marker hat gezeigt, dass Desmin und smA in der 6. Passage gegenüber der 2. Passage stark reduziert waren. Desmin war kaum noch detektierbar. Außerdem waren beide Filamente in den gewaschenen Zellen weniger exprimiert als in den nach der Standardmethode isolierten Zellen, unabhängig von der Passage. CD31 war schon zu Beginn nur leicht exprimiert und war ebenfalls in der 6. Passage kaum noch nachweisbar. CD146 zeigte eine leichte Verringerung der Expression in den Standard-ASC und eine leichte Erhöhung der Expression in den gewaschenen Zellen. CD34 war stärker in den Standard-ASC exprimiert, als in den gewaschenen Zellen; in der 6. Passage waren die CD34 positiven Zellen in beiden Isolationen erhöht.

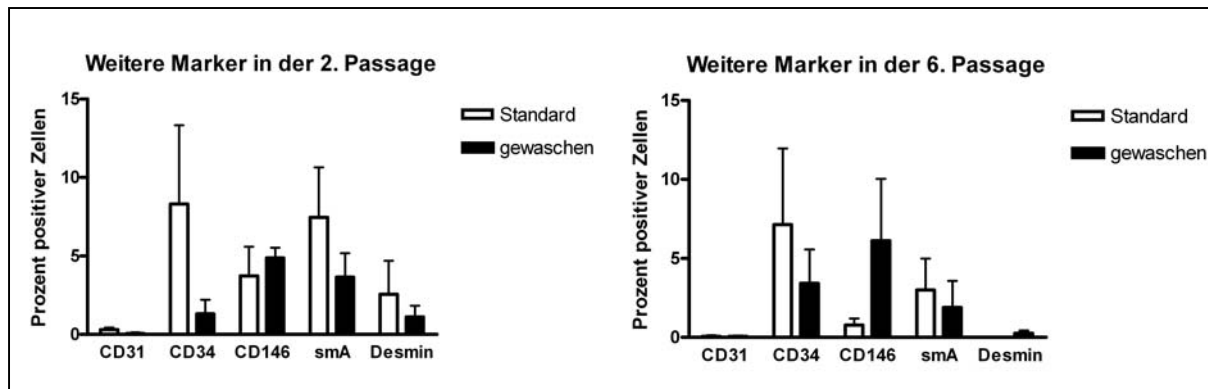


Abb. 59 *Zusätzliche Analyse zur Charakterisierung von ASC. Vergleich zwischen den nach der Standardmethode isolierten und den nach 1h gewaschenen ASC einer frühen (p2) und einer späten Passage (p6) in der Durchflusszytometrie (n=4 (p2) and n=5 (p6)). CD34, smA, und Desmin wurden in den gewaschenen Zellen geringer exprimiert, während CD31 fast nicht nachweisbar war. CD146 war in den gewaschenen Zellen nach sechs Passagen erhöht. Die ASC verloren über die Zeit Desmin fast vollständig, unabhängig von der Isolationsmethode. SmA war ebenfalls deutlich reduziert im Vergleich zur zweiten Passage.*

In der qPCR konnte für die gewaschenen ASC im Vergleich zu den nach der Standardmethode isolierten ASC eine signifikante Reduzierung der Expression von smA, Desmin und six 2, sowie eine signifikante Erhöhung der Expression von Nestin, oct4 und sall1 nachgewiesen werden.

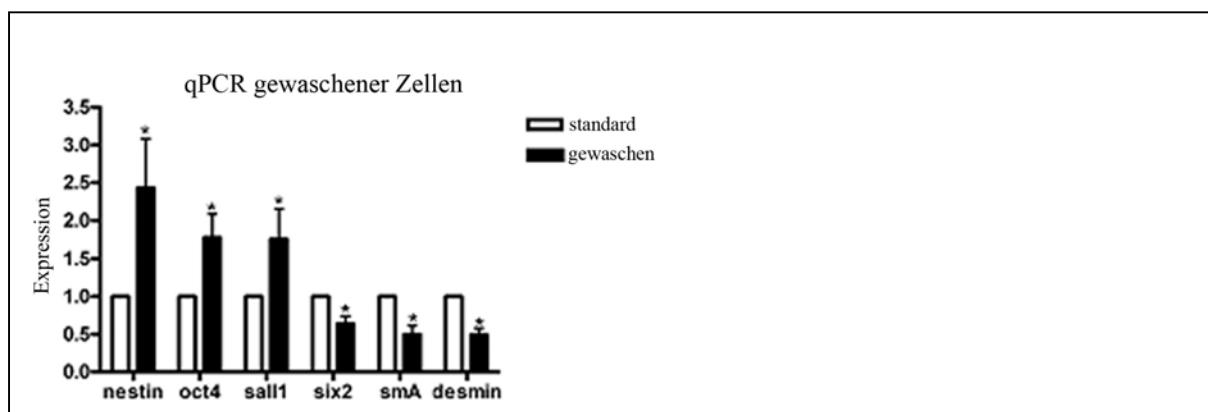


Abb. 60 *qPCR Analyse von isolierten ASC mit der Standardmethode und nach 1h gewaschenen Zellen. Angegeben ist der Durchschnitt der relativen Expression von Nestin, oct4, sall1, six2, smA und Desmin (n=5). Die mit mesenchymalen Stammzellen assoziierten Transkriptionsfaktoren oct4, sall1 und das mit Stammzellen assoziierte Filamentprotein Nestin wurden in den gewaschenen ASC höher exprimiert, während smA, Desmin and six2 in ihrer Expression reduziert waren. Alle Marker wurden signifikant verändert exprimiert (* = statistisch signifikant (p-Werte < 0,05)).*

Die Analyse der Oberflächenmarker bei den immunomagnetisch isolierten Zellen zeigte weniger Unterschiede und keine Signifikanzen.

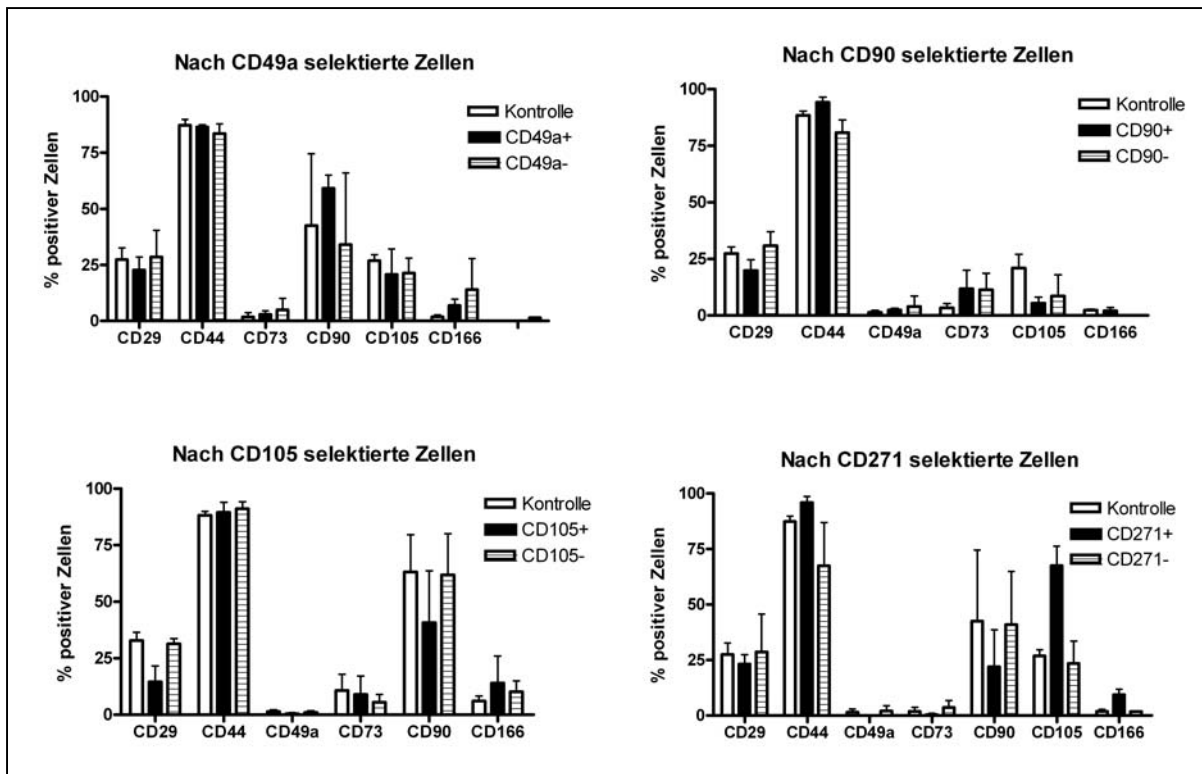


Abb. 61 Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern immunomagnetisch isolierter ASC. Immunomagnetisch isolierte Zellen (CD49a, CD90, CD105 und CD271) wurden mit nach der Standardmethode isolierten Zellen und der Negativfraktion in der Durchflusszytometrie verglichen. Die Negativfraktion ist hierbei der Durchlauf bei der immunomagnetischen Isolation und enthält somit die nicht spezifisch markierten ASC, die durch das magnetische Feld nicht zurückgehalten werden ($n=3$, außer CD271 und CD90- mit $n=2$). Außer bei der Expression von CD105 und CD44 in CD271+ Zellen wurden keine signifikanten Unterschied detektiert.

Die Ergebnisse der qPCR der immunomagnetisch aufgereinigten Zellen sind nicht eindeutig. Im Vergleich von Zellen nach der Standardmethode wurden die Positivfraktion und die Negativfraktion der jeweiligen CD Antigene untersucht. Dabei zeigten sich bei CD49a und CD90 selektierte Zellen keine signifikanten Unterschiede. Bei den CD105⁺ Zellen ist die Desmin Expression signifikant erhöht. Die CD271⁻ Zellen wiesen eine erhöhte Expression von six2 auf.

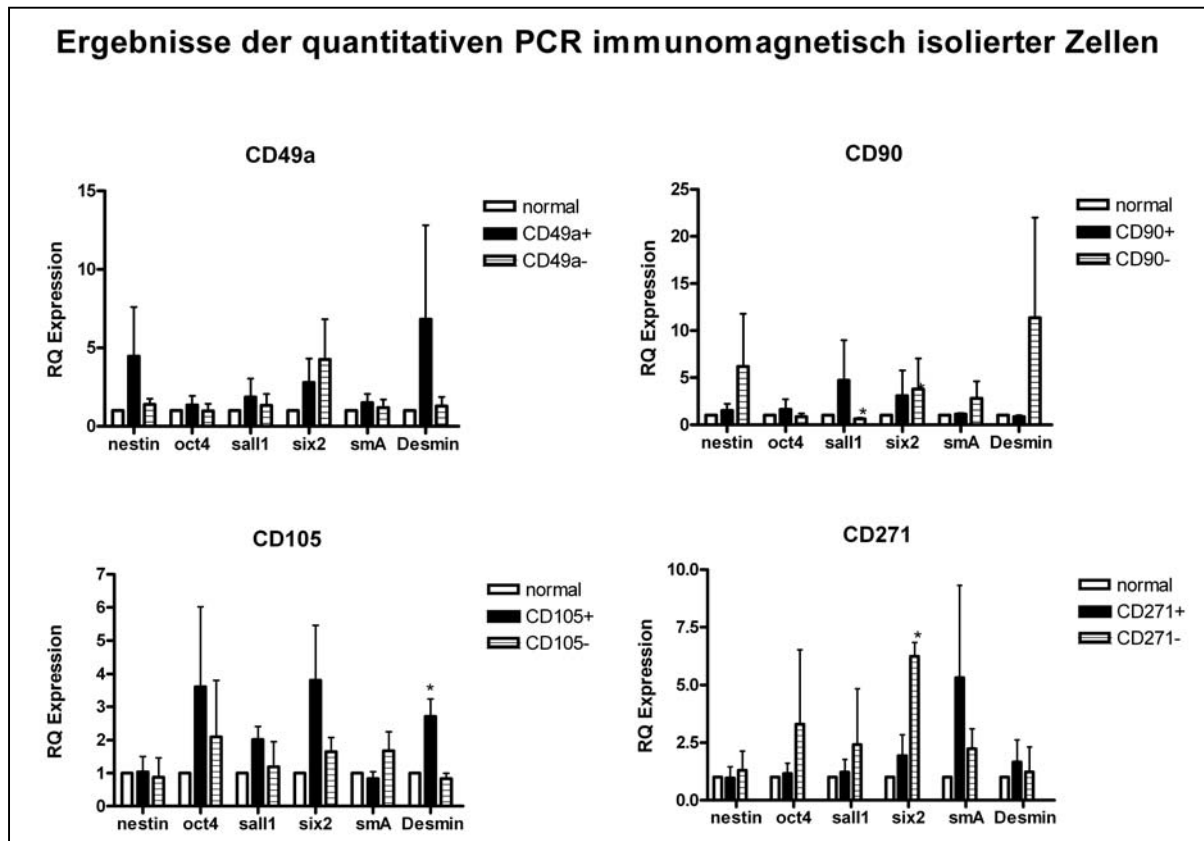


Abb. 62 qPCR Analyse von isolierten ASC mit der Standardmethode und nach den immunomagnetischen Zellen. Angegeben ist der Durchschnitt der relativen Expression von Nestin, oct4, sall1, six2, smA und Desmin ($n=3$). Es wurden keine relevanten signifikanten Unterschiede in der Genexpression festgestellt.

Außerdem wurde die Fähigkeit der ASC in adipogene und osteogene Zellen zu differenzieren untersucht. Nach der Kultivierung für 21d in adipogenem oder osteogenem Medium wurden die Zellen mit Oil-Red-O und Van Kossa gefärbt. Die Differenzierungsfähigkeit der ASC wurde durch die Isolationsmethoden nicht beeinflusst. Alle getesteten ASC konnten durch das adipogene oder osteogene Differenzierungsmedium in die entsprechende Linie induziert werden. Das adipogene Medium verlangsamt die Proliferation und verursacht das Absterben einiger Zellen. Osteogenes Medium erhöht die Proliferation der ASC. Abbildung 63 zeigt am Beispiel von CD271⁺, CD271⁻ und nach der Standardmethode isolierte Zellen nach der 21-tägigen Kultivierung mit den Differenzierungsmedien Oil-Red-O und Van Kossa gefärbte Zellen. Die rot gefärbten Lipidtröpfchen bei der Oil-Red-O-Färbung zeigen die adipogene Differenzierung, die gefärbten Ablagerungen in den Bildern D, E und F die osteogene Differenzierung. Die mitgeführte Kontrolle mit DF Medium wies weder adipogene noch osteogene Differenzierung auf. In dem nachfolgenden Diagramm ist angegeben, wie viel Prozent der ASC in die adipogene Richtung differenzierten. Die Auswertung erfolgte über

eine Auszählung von zehn Sichtfeldern. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

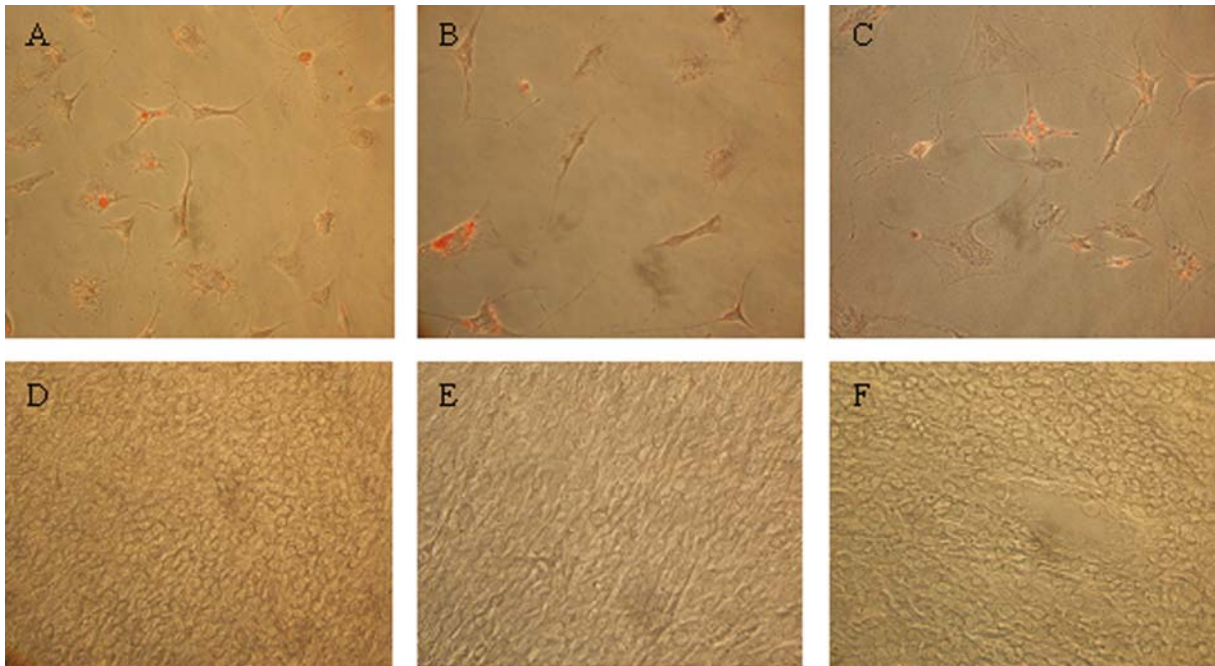


Abb. 63 Differenzierungspotential von ASC. Die Bilder zeigen exemplarisch in der ersten Reihe die Oil-Red-O Färbung von A) isolierten Zellen nach der Standardmethode im Vergleich zu B) immunomagnetisch nach CD271 selektierten ASC und C) deren Negativfraktion, die 21 Tage mit adipogenem Medium kultiviert wurden. Die zweite Reihe zeigt die Von Kossa Färbung von D) isolierten Zellen nach der Standardmethode, E) immunomagnetisch isolierten Zellen nach CD271 und F) die Negativfraktion der nach CD271 isolierten ASC nach der Behandlung mit osteogenem Medium.

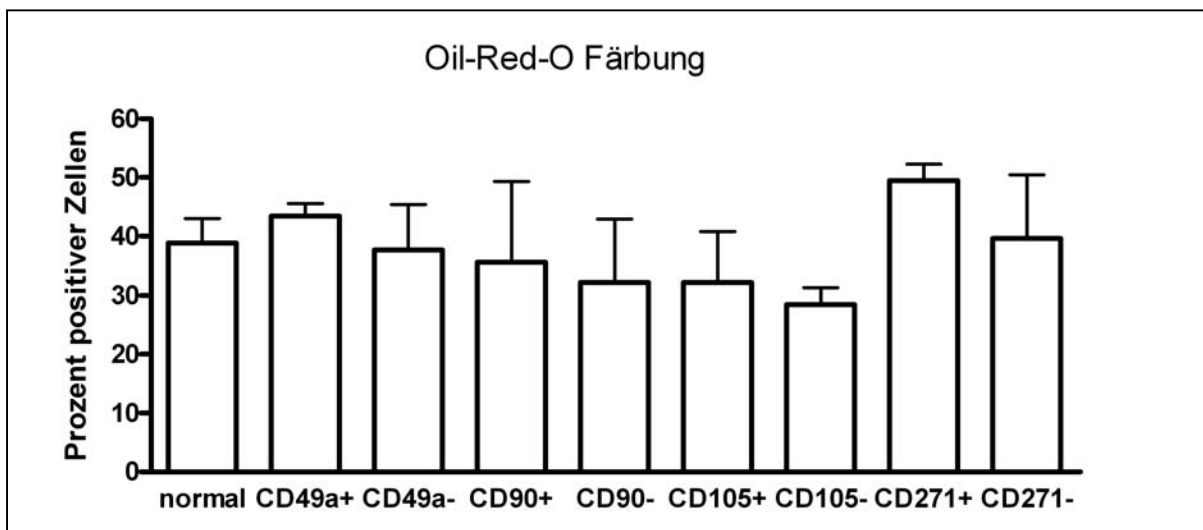


Abb. 64 Prozent positiver Zellen nach adipogener Induktion MACS isolierter Zellen; die Abbildung zeigt die Anzahl der Zellen mit angefärbten Vakuolen, d.h. die positiven Zellen, im Verhältnis zur Gesamtzahl ($n=2-6$).

Abbildung 65 zeigt die mit DF Medium kultivierten und nicht differenzierten Zellen im Vergleich zu den mit adipogenem Medium differenzierten Zellen sowohl bei den gewaschenen als auch bei den nach der Standardmethode isolierten ASC. Die mit adipogenem Medium für 21 Tage kultivierten ASC (A,C) zeigten die Bildung von Lipidtröpfchen, die mit der Oil-Red-O-Färbung nachgewiesen wurden. Die Zellen differenzierten also in die adipogene Richtung. Die mit normalem DF Medium durchgeführten Kontrollen zeigten keinerlei Differenzierung (B, D). Ein Unterschied zwischen den gewaschenen und den Standard isolierten Zellen war nicht zu erkennen.

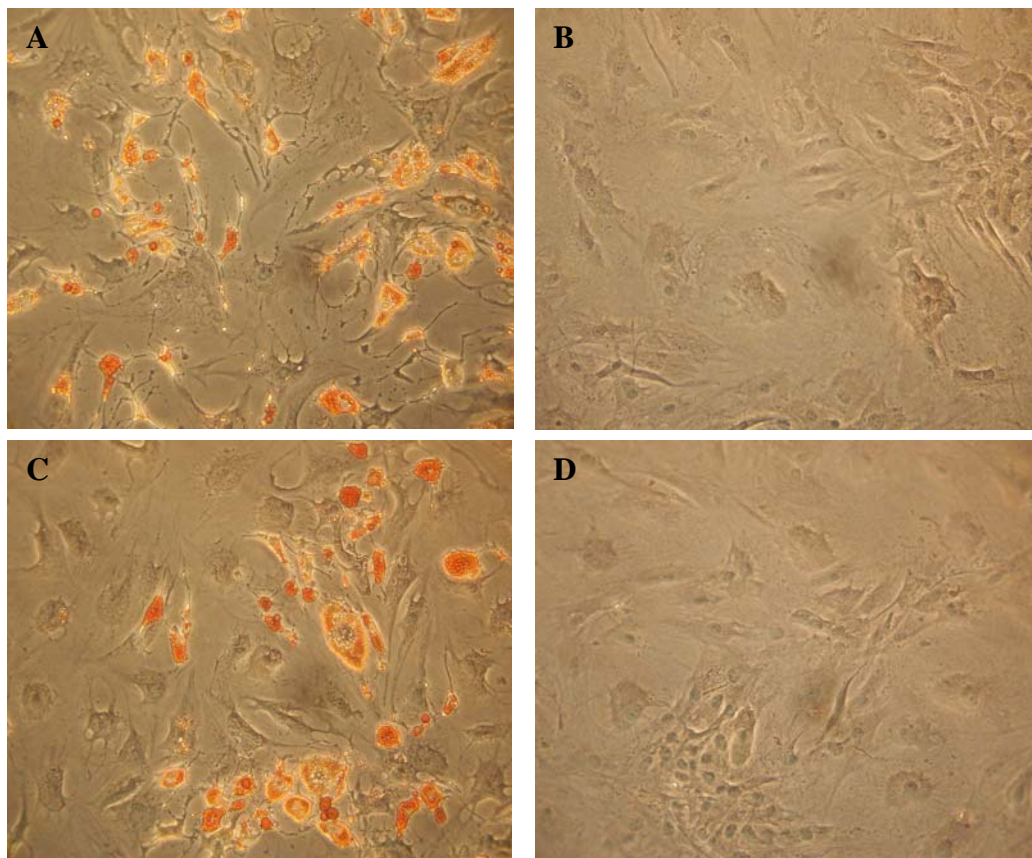


Abb. 65 Oil-Red-O-Färbung gewaschener und Standard isolierter Zellen; Abbildung A zeigt die mit adipogenem Medium (AM) stimulierten gewaschenen ASC nach 21d, Abbildung B die mit DMEM Medium (10% FKS) kultivierten Zellen. Die Abbildungen C und D zeigen die Standard isolierten Zellen mit AM (C) und DMEM (D).

Ein Vergleich zwischen nach der Standardmethode isolierten Zellen und gewaschenen Zellen zeigte sich, dass die gewaschenen Zellen mit $53 \pm 13,7\%$ stärker in die adipogene Linie differenzieren. Die Standard isolierten ASCs differenzieren zu $41 \pm 4\%$. Der Unterschied ist nicht statistisch signifikant.

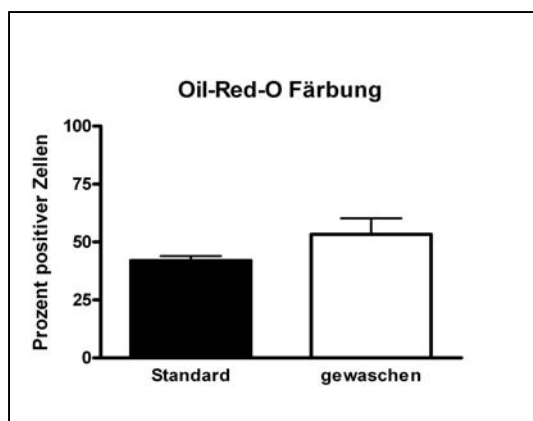


Abb. 66 Prozent positiver Zellen nach der adipogenen Induktion; die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der Zellen, die bei der Oil-Rd-O-Färbung positiv waren (n=4).

Tab. 12 Oil-Red-O- Färbung gewaschener und Standard isolierter Zellen

	Mittelwert	Mittelwert
gewaschen	Zellzahl \pm SD	Prozente \pm SD
Positive Zellen	32,48 \pm 23,23	53,33 \pm 13,71
Gesamtzahl	56,08 \pm 25,45	
normal		
Positive Zellen	26,03 \pm 5,84	42,01 \pm 3,99
Gesamtzahl	61,50 \pm 10,28	

4. Diskussion

Adulte mesenchymale Stammzellen kommen in fast allen Geweben im Körper vor [da Silva Meirelles et al., 2006]. Bereits Ende der 60er Jahre wurde die Isolation mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark beschrieben; in den letzten Jahren wurden MSC dann aber auch aus immer weiteren Quellen wie Nabelschnurblut und Fettgewebe isoliert. MSC aus Fettgewebe haben dabei dieselben Eigenschaften wie aus Knochenmark isolierte MSC, ohne Unterschiede in ihrer Wachstumskinetik, Zellseneszenz oder dem Differenzierungspotential [DeUgarte et al., 2003].

In renalen Glomeruli wurden ebenfalls Stammzellen nachgewiesen [Bruno et al., 2009], die isoliert und *in vivo* in mesangiale Zellen differenziert werden konnten [Wong et al., 2008]. Imai et al. [2009] postulierten, dass nur ein kleiner Teil der zur Regenerierung der Niere beitragenden Zellen von außerhalb stammt und daher parakrine und nicht zelluläre Mechanismen wirken. Die Zellen residieren in der Niere und werden durch ihre Umgebung geprägt. Die spezifischen Stammzellen sollen in den jeweiligen Organen in einer Nische vorliegen, die das Überleben, die Selbsterneuerung und die Differenzierung der Zellen steuert. Bei dieser Regulierung spielen Wachstumsfaktoren, Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix Adhäsionen eine Rolle. Besonders Wachstumsfaktoren werden zeitlich und räumlich begrenzt ausgeschüttet. Die extrazelluläre Matrix vermittelt dabei nicht nur Zellverbindungen, sondern bindet auch Wachstumsfaktoren und kann so deren Diffusion verhindern [Discher et al., 2009]. Die Therapie von Verletzungen wie Myokardinfarkt [Li et al., 2009], Wundheilung [Sasaki et al., 2006; Wu et al., 2007;] oder Nierenschädigung durch Ischämie [Kale et al., 2003] durch applizierte MSC zeigte eine deutliche funktionelle Verbesserung im Tiermodell. Neben parakrinen Faktoren konnte auch die Integration von MSC in das geschädigte Gewebe mit anschließender Differenzierung nachgewiesen werden [Kale et al., 2003]. Der genaue Wirkmechanismus ist aber nach wie vor nicht geklärt.

4.1. Einfluss löslicher Faktoren auf die Differenzierung von Stammzellen aus Fettgewebe in epitheliale Tubuluszellen

Viele Arbeiten zur regenerativen Medizin mit MSC haben gezeigt, dass die Zellen meist nicht in das Gewebe integriert werden [Li et al., 2009; Tögel et al., 2005, 2007]. Ein parakriner Effekt scheint also *in vivo* die Hauptursache für die Verbesserung der Funktionalität nach Verletzungen wie beispielsweise dem Myokardinfarkt zu sein [Prockop, 2007]. Wenn also die

Integration von Stammzellen in das Gewebe nicht für die verbesserte Regeneration verantwortlich ist, sondern nur parakrine Einflüsse ausschlaggebend sind, könnten auch lösliche Faktoren für die Differenzierung von MSC ausreichen.

Die Nephrogenese verläuft über verschiedene Signalwege. Dabei spielt nicht nur der Signalweg, sondern auch die Dauer und Lokalisation der Aktivierung eine Rolle. Ebenso werden verschiedene Abschnitte der Nierenentwicklung über unterschiedliche Signalwege reguliert. Das Wachstum und die Verzweigung in der Ureterknospe werden durch den cRet/GDNF (Ligand; von Glia-Zelllinien stammender neurotropher Faktor) Signalweg reguliert [Davies et al., 2002; Perantoni 2003]. cRet wird in der Spitze der Ureterknospe im Metanephros exprimiert und kann durch den Transkriptionsfaktor Pax2 oder Mitglieder der FGF Familie (KGF, FGF-10) induziert werden. Das Nierenmesenchym wird durch wnt Signalwege aktiviert. Der wnt Signalweg wird grundsätzlich in den kanonischen und den nicht kanonischen wnt Signalweg eingeteilt. Der kanonische Weg läuft über β -Catenin als kritischen Faktor für die Signaltransduktion. Die Bindung der wnt Liganden findet unabhängig vom Signalweg über Frizzled Rezeptoren statt. Ohne die Liganden liegt zytoplasmatisches β -Catenin in einem Komplex aus Axin, adenomatöse Polyposis Coli Protein (APC), die Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK3 β) und die Casein Kinase 1 (CK1) vor. Über das β -transducin repeat-containing homologe Protein (β TrCP) wird das β -Catenin phosphoryliert und anschließend über Ubiquitinylierung degradiert. Bindet wnt an den Rezeptor, wird der Multifaktorenkomplex zerstört indem Axin über das Protein dishevelled (Dsh) an die Membran gebunden wird. Das β -Catenin transloziert in den Nukleus und aktiviert über den T-Zellfaktor/Lymphoid enhancer Faktor (TCF/LEF) die Expression des Targetgens [Nemeth et al., 2007]. Die Signaltransduktion über TCF/LEF kann auch über den TGF- β Signalweg aktiviert werden. Der nicht kanonische wnt Signalweg läuft über die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (wnt/ Ca^{2+}), reguliert die Zellmotilität über die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase oder die Ausbildung planarer Zellpolarität (PCP) [Perantoni 2003; Dressler 2006]. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte wnt-4 wird in den mesenchymalen Aggregaten exprimiert und ist wichtig für die Bildung von Tubuli, indem es die epitheliale Konversion des metanephrischen Mesenchyms vermittelt. Wnt-4 wird wiederum von wnt-9b induziert [Hopkins et al., 2009]. Die wnt-4 Signale hängen von Zellkontakten und sulfurierten Glykosaminoglykanen (Co-Faktoren bei der Bindung an die Zelle) ab [Kispert et al., 1998]. Die wnt Proteine sind mit Heparinsulfat Proteoglykanen assoziiert und daher nicht frei diffusionsfähig [Dressler, 2006]. Wnt-4 kann in seiner Funktion aber auch durch wnt-1, 3a, 7a oder 7b ersetzt werden [Kispert et al., 1998]. Auch die Funktion

anderer wnt-Proteine ist bekannt, so kann wnt-5a beispielsweise die GSK3 β unabhängige Ubiquitinylierung von β -Catenin bewirken [Nemeth et al., 2007]. Die Entwicklung in die proximale und distale Achse des Nephrons wird über Notch Signalwege geleitet [Dressler, 2006]. Besonders bei Verletzungen der Niere sind die Notch Gene vermehrt exprimiert, was diesen Signalweg auch als einen Ansatzpunkt in der regenerativen Medizin interessant machen könnte. Das Prinzip des Notch Weges besteht aus einem Liganden (Jagged, Delta-like) auf einer Zelle und dem Notch Rezeptor auf einer angrenzenden Zelle. Konformationsänderungen im Notch Rezeptor führen zu einer Spaltung des Rezeptors durch eine extrazelluläre Metalloproteinase und anschließend zu einer Freisetzung der intrazellulären Notch Domäne durch eine Presenilin abhängige Protease, die im Nukleus die Transkription bestimmter downstream Gene aktiviert. Während der Entwicklung der Niere ist außerdem der Signalweg über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) beteiligt. Der MAPK Signalweg kann in drei Hauptgruppen eingeteilt werden, den ERK Signalweg, der vorwiegend über Mitogene stimuliert wird, den cJun N-terminale Kinase (JNK) und den p38 Signalweg, welche beide von Stress und inflammatorischen Zytokinen aktiviert werden können. Bei dem MAPK Weg führt eine dreistufige Phosphorylierung zur Aktivierung, die reversibel ist. Die MAPK-ERK Kaskade wird auch über den TGF- β Signalweg aktiviert, der sonst auch über Smad Proteine laufen kann.

Ausgelöst werden solche Signalwege während der Nephrogenese durch pro- und antitubulogene Faktoren wie FGF, TGF- β , EGF, HGF, GDNF und die Liganden der wnt-Familie, worüber dann Zellproliferation, Migration und Morphogenese reguliert werden. Parallel zu den verschiedenen löslichen Faktoren wird die Bildung von Tubuli auch über Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen reguliert [Karihaloo et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit wurden lösliche Faktoren zur Induzierung der Differenzierung von ASC in epitheliale Zellen angewendet, die bei der Entwicklung der Niere eine Rolle spielen. Die BMP-Familie moduliert beispielsweise die Ureterknospe. Die Wirkung von BMP-7, welches vom Mesenchym und, noch stärker, vom Epithel produziert wird, auf die Tubulogenese ist dosisabhängig. Eine geringe Dosis kann die Tubulusbildung stimulieren, während eine hohe Dosis sie inhibiert [Davies et al., 2002]. BMP-7 kann über eine Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs wirken [Karihaloo et al., 2005]. HGF wird im metanephrischen Mesenchym im Rahmen der Entwicklung der Sammelrohre exprimiert und stimuliert Wachstum und Verzweigung des Sammelrohrsystems [Gupta et al., 2000]. Bei der HGF- induzierten Tubulogenese spielen cMet/PI3K und die Aktivierung von ERK1/ERK2 eine Rolle. Bei der

Induzierung der epithelialen Differenzierung von ASC mittels konditionierten Mediums wurde die Phosphorylierung von ERK1/ERK2 beschrieben [Baer et al., 2009].

bFGF wird von der Ureterknospe produziert und soll den Stammzellzustand von MSC erhalten. KGF, was ebenfalls zur FGF Familie gehört, spielt eine Rolle im cRet Signalweg. Die Tubulogenese in spezifischen Epithelzellen wird über den EGF-Rezeptor, der den MAPK Signalweg aktivieren kann, reguliert. Liganden für diesen Rezeptor sind u.a. EGF und TGF- α . Baer et al. [2009] zeigten, dass EGF die Phosphorylierung von ERK1/ERK2 induziert.

4.1.1. Medienzusammensetzung und HGF Sezernierung

Die Kulturbedingungen können MSC stark beeinflussen und so die Vermehrung bestimmter Zellpopulationen selektiv beeinflussen [Esposito et al., 2009; Wagner und Ho, 2007]. Die MSC können sich dadurch in einen leicht veränderten Immunphänotyp, das Potential zur Selbsterneuerung bis hin zur Differenzierungsfähigkeit der Zellen unterscheiden. In dieser Studie zeigte sich, dass die Zugabe von fötalem Kälberserum die Proliferation stark erhöhte. Ohne FKS wachsen die Zellen nicht, was durch den Vergleich von DMEM Medium ohne bzw. mit einer verminderten Menge von 2% FKS mit dem Standardmedium mit 10% FKS gezeigt werden konnte. Da die FKS Zusammensetzung nicht genau definiert werden kann und für den Einsatz in der Regenerativen Medizin Risiken birgt, sollte es so weit wie möglich ersetzt oder zumindest reduziert werden. Lepperdinger et al. [2008] diskutierte die Sicherheit der Therapie mit MSC, wobei die Alterung der MSCs, die mögliche Aktivierung von latenten Tumoren und die Verwendung von FKS mögliche Sicherheitsrisiken darstellen. Das Auftreten von Tumoren ist nur ein geringes Risiko, da es bisher nur einmal beschrieben wurde, wo MSC zusammen mit Tumorzellen das Tumorwachstum in Mäusen *in vivo* begünstigen konnten [Zhu et al., 2006]. Durch FKS könnten Prionen und Zoonosen übertragen werden oder Abwehr gegen die fremden tierischen Faktoren entstehen. Lee et al. [2009] ersetzte das FKS mit einer Mischung aus bFGF und Dexamethason, was zu einer erhöhten Proliferation unter Erhaltung des Stammzellpotentials führte. bFGF ist ein häufig verwendeter Wachstumsfaktor in Kulturmedien für Stammzellen, der aber u. a. die Differenzierung in die osteogene Linie begünstigt [Sotiropoulou et al., 2006]. Da bFGF in meinen Versuchen die Zellmorphologie veränderte und Dexamethason in Differenzierungsmedien enthalten ist, ist der Einsatz von bFGF in einem Standard Kulturmedium nicht vorbehaltlos anwendbar. Im Kulturmedium kann es nur in sehr geringen Konzentrationen eingesetzt werden (1ng/ml) [Lee et al., 2009]. Auch Iwashima et al. [2009] fügten dem Medium zum Ausgleich bei einer Reduktion des

Serums auf 2% FKS bFGF hinzu, was zu einer höheren Sezernierung von VEGF und HGF führte, die beide wichtige Faktoren in der Angiogenese und bei der Geweberegeneration sind. Die erhöhte Sezernierung in das Medium führte bei Endothelzellen zu einer gesteigerten Proliferation und verminderter Apoptose [Iwashima et al., 2009].

bFGF ist in der frühen Phase der Nephrogenese und nach akutem Nierenversagen durch Ischämie ebenfalls exprimiert und gilt außerdem als Morphogen für die mesenchymale zu epithelialer Transformation. Andere Proteine wie BMP-7 und VEGF werden bei Verletzungen der Niere auch aktiviert [Villanueva et al., 2006]. Die Aktivierung der Sezernierung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren, die bei Verletzungen auftritt, steht im Zusammenhang mit der Regeneration des betroffenen Gewebes. Auch MSC sezernieren unterschiedliche Wachstumsfaktoren, was durch die Kultur mit verschiedenen Medienzusätzen ausgelöst oder verstärkt werden kann. So konnte gezeigt werden, dass HGF, hämatopoetische und proinflammatorische Faktoren sezerniert wurden. Der therapeutische Effekt von ASC wird dabei auch auf die Sezernierung von angiogenen Faktoren wie VEGF und HGF zurückgeführt [Kilroy et al., 2007]. Die Induktion der HGF Sezernierung mit bFGF und EGF konnte in meinen Studien ebenfalls gezeigt werden, aber auch die Zytokine TNF und IL1 β beeinflussten die HGF Sezernierung positiv.

Lösliche Faktoren wie Wachstumsfaktoren und Zytokine wurden in ihrer Wirkung auf die Stammzellen aus Fettgewebe untersucht. Die Faktoren wurden einzeln oder in Kombinationen eingesetzt, um so die Differenzierung von ASC in Epithelzellen voranzubringen. Für die Differenzierung in einige andere Zelllinien ist die Zugabe von induktiven Faktoren zum Medium ausreichend, um eine vollständige Differenzierung zu erreichen. Gimble et al. [2007] fasste übersichtlich zusammen, in welche Zelltypen und durch welche induktiven Faktoren ASC differenziert werden können. So kann beispielsweise eine Differenzierung in Myozyten durch die Anwendung von Dexamethason und Pferdeserum herbeigeführt werden.

4.1.2. ATRA, Activin A und BMP-7

Die Differenzierung in Richtung epithelialer Zellen wurde mit all-trans-Retinolsäure (ATRA) induziert, was zuvor in unserem Labor durch die Expression von Zytokeratin 18 als epithelialen Marker nachgewiesen werden konnte [Brzoska et al., 2006]. ATRA ist ein aktiver Metabolit von Vitamin A, welcher eine große Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielt und diese über Signaltransduktionswege reguliert. Retinolsäure ist über die Bindung an den Retinolsäure Rezeptor (RAR) und den Retinol-x-Rezeptor (RXR) an der Signaltransduktion

beteiligt, die im stromalen Mesenchym exprimiert sind [Zile 1998], wobei die all-trans-Retinolsäure ausschließlich über den RAR gebunden wird [Neuville et al., 1998]. Kim und Dressler [2005] zeigten die Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen in renale Epithelzellen über die Induktion mit ATRA, Aktivin A (ActA) und BMP-7. In einem weiteren Schritt zeigten sie im Mausmodell, dass diese vordifferenzierten Zellen in die sich entwickelnde Niere integriert wurden. ActA reguliert die Differenzierung und das Wachstum von proximalen Tubuluszellen mit einem autokrinen Wirkmechanismus [Maeshima et al., 2002]. Aktivin gehört zur TGF- β Familie und kann über den TGF- β Signalweg oder den MAPK Weg wirken. BMP-7 ist vor allem für das Knochenwachstum von Bedeutung, wird aber auch während der Tubulogenese exprimiert und wirkt in einer geringen Dosis stimulierend. Es wird bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Embryogenese exprimiert, wodurch eine Beteiligung an der Entwicklung nahe liegt. In meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination mit Aktivin A und BMP-7 den induktiven Effekt von ATRA noch verstärkte. Alleine konnten ActA und BMP-7 die Differenzierung in die epitheliale Richtung nicht induzieren. Die Kombination aus ATRA, ActA und BMP-7 löste also auch bei humanen ASC und nicht nur bei murinen ES [Kim und Dressler, 2005] eine epitheliale Differenzierung aus. Bei der weiteren Untersuchung der Differenzierung dienten Zytokeratin 18, Aquaporin 1, Occludin, Zona Occludens 1 und E-Cadherin, die in epithelialen Tubuli exprimiert werden, als Marker. Zytokeratine sind eine der ersten epithelialen Strukturproteine, die bei der Differenzierung in Epithelzellen gebildet werden. Zytokeratin 18 ist ein Typ 1 Intermediärfilament und zählt zu den häufigsten Mitgliedern dieser Familie. Es wird in einschichtigem epitheliale Gewebe exprimiert. Bei Occludin handelt es sich um ein integrales Membranprotein, welches in Tight Junctions lokalisiert ist. Bei Vertebraten gibt es vier Arten von Zell-Zell-Verbindungen: Tight junctions, adherence junctions, gap junctions und Desmosomen. Die TJ grenzen epitheliale Zellen voneinander ab, kontrollieren den Übergang von Ionen, Wasser und anderen Molekülen zwischen Zellen und erhalten die Polarität der epithelialen Zellen. ZO-1 ist an der Oberfläche von Zytoplasmamembranen bei interzellulären TJ lokalisiert, interagiert mit Occludin und ist schwach in proximalen Tubuluszellen, stark an den Grenzen der distalen Zellen exprimiert. Es wird vermutet, dass ZO-1 an der Signaltransduktion bei Zell-Zell-Junktionen beteiligt ist. [Feldman et al., 2005]. Aquaporin 1 fungiert als ein molekularer Wasserkanal. Es ist ein Homotetramer mit sechs Doppelschichten die Domänen und N-Glykosilierungsstellen umfasst. Das Protein ist in renalen Tubuli und in Erythrozyten vorhanden, wobei es hauptsächlich in proximalen Tubuli und dem dünnen absteigenden Ast der Henle Schleife exprimiert ist. E-Cadherin gehört zur

Superfamilie der Cadherine und ist ein Calcium abhängiges Zell-Zell bindendes Glykoprotein, das aus fünf extrazellulären Wiederholungseinheiten, einer transmembranen Region und einem cytoplasmatischen Schwanz besteht. Die auf Proteinebene im Western Blot in dieser Arbeit nachgewiesene signifikant erhöhte Expression von CK18 bei der Kultur mit ATRA, ActA und BMP-7, oder nur ATRA alleine in geringerem Maße, konnte auch in der quantitativen PCR gezeigt werden. E-Cad, Occ und ZO-1 hingegen wurden unverändert exprimiert. Auf der Proteinebene konnte im Western Blot eine erhöhte ZO-1 Expression nachgewiesen werden. Zwischen RNA- und Proteinebene können Unterschiede bestehen. Da Occ und ZO-1 beide miteinander interagieren ist es vorstellbar, dass sie auch gemeinsam reguliert wurden.

Zusätzlich wurde die wnt-4 Expression untersucht, dem als Signalproteinen eine Rolle in der Onkogenese und Entwicklungsprozessen zugesprochen wird. Kispert et al. [1998] wiesen mit der Anwendung von Co-Kulturen mit Membraneinsätzen unterschiedlicher Porengrößen nach, dass wnt-4 auf Zellkontakt angewiesen ist. Eine verminderte Expression, wie sie in meiner Arbeit bei der Induktion mit löslichen Faktoren festgestellt wurde, könnte also auf dem fehlenden Zellkontakt zurückgeführt werden. Eine weitere mögliche Erklärung liegt bei der begrenzten wnt-4 Expression, die die Tubulogenese einleitet, nicht aber für die weitere Entwicklung verantwortlich ist [Kispert et al., 1998]. Der Zeitpunkt der Messung würde in diesem Fall nicht mit dem Beginn der Tubulogenese zusammenfallen. Warum die wnt-4 Expression allerdings im Vergleich zu den nicht induzierten ASC herunter reguliert wurde, lässt sich dadurch nicht erklären. Terada et al. [2003] zeigte, dass wnt-4 mit Aquaporin 1 co-exprimiert wird. In meinen Versuchen wurde Aquaporin 1 auf ASC nach der Induktion mit verschiedenen Medien nicht exprimiert, was im Zusammenhang mit der geringeren wnt-4 Expression der induzierten ASC stehen könnte.

4.1.3. EGF, KGF, HGF und IGF-2

Andere Kombinationen an Faktoren riefen ebenfalls eine Differenzierung von MSC in epithelartige Zellen hervor. In einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass konditioniertes Medium von proximalen epithelialen Tubuluszellen eine epitheliale Differenzierung von ASC induzieren kann. Nachgewiesen wurde die epitheliale Differenzierung über einen Anstieg in der CK18 Expression und eine Reduktion typischer Marker von ASC wie CD90. Morphologisch nahmen die Zellen einen epithelialen Charakter an und auch die Signaltransduktion wurde über die Phosphorylierung von ERK1/ERK 2

gezeigt [Baer et al., 2009]. Die aus Knochenmark gewonnenen MSC wurden über die Kombination aus EGF, KGF, HGF und IGF-2 differenziert [Paunescu et al., 2007]. Die Verwendung des WT-Mixes konnte in ASC keine nachweisbare epitheliale Differenzierung herbeiführen, obwohl die Zellmorphologie verändert war. Minimale Unterschiede zwischen BM-MSC und ASC oder unterschiedlicher Einflüsse bei der Isolation und Kultivierung könnten der Grund dafür sein. Die Anwendung dieser Faktoren hätte durchaus eine epitheliale Differenzierung induzieren können, da HGF einen renotropen Einfluss bei der Entwicklung der Niere und der Regenerierung von renalen Schädigungen haben soll. KGF ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für epitheliale Zellen und IGF-2 ist an der Entwicklung und dem Wachstum in embryonalem und neonatalem Gewebe beteiligt. Die Untersuchung der Wirkung acht verschiedener Wachstumsfaktoren auf embryonale Stammzellen von Schuldiner et al. [2000] führte zu dem Schluss, dass ActA und TGF- β 1 die Differenzierung in die mesodermale Richtung beeinflussten. Retinolsäure, EGF, bFGF und BMP-4 begünstigten eine Differenzierung in mesodermale und ectodermale Gewebe und HGF oder NGF in alle drei Keimzellbahnen. Die Differenzierung war dabei nicht auf einen genauen Zelltyp ausgerichtet [Schuldiner et al., 2000]. Das lässt vermuten, dass Wachstumsfaktoren die Richtung für eine vollständige Differenzierung vorgeben können, aber auch der Einfluss der Zellumgebung oder Zell-Zell-Kontakt wichtig ist.

4.2. Einfluss von extrazellulären Matrices auf die Differenzierung von Stammzellen aus Fettgewebe

Zellen im Gewebe bilden mit mindestens einer Seite einen Kontakt mit der extrazellulären Matrix aus. Durch die Proteininteraktionen gewinnen die Zellen strukturelle Unterstützung und stehen in Kontakt mit biologischen Signalen, die die Differenzierung regulieren können [Philp et al., 2005]. Schumacher et al. [2008] zeigten die Bildung von Tubuli aus Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen oder humanen mikrovaskulären Endothelzellen in Matrigel *in vitro*. Durch die Bildung von Kanälen in Matrigel, in die die Zellen ausgesät wurden, formten sich gerichtete tubuläre Strukturen. Die Ausbildung eines Lumens konnte nachgewiesen werden. Philp et al. [2005] haben ebenfalls die Differenzierung von Stammzellen in tubuläre Strukturen gezeigt. Die Kultur fand in einem rotierenden Bioreaktor mit einer simianen embryonalen Stammzelllinie in Matrigel statt. Die Bildung von unreifen drüsenartigen und tubulären Strukturen konnte schon nach vier Tagen gezeigt werden. Teilweise bildeten diese Zellen auch hier ein Lumen inklusive polarisiertem Epithel und

Microvilli aus. Die Kultur von ES auf Collagen I oder Laminin 1 konnte aber die Differenzierung nicht induzieren [Philp et al., 2005]. Xu et al. [2001] hingegen nutzten Matrigel für die Erhaltung und Expansion embryonaler Stammzellen. Sie beschreiben einen normalen Karyotyp, eine stabile Proliferationsrate und Differenzierungskapazität und zeigten außerdem die Expression von Stammzellmarkern wie oct4 und SSEA-4. Masubara et al. [2004] beschrieb ebenfalls, dass die Kultur von MSC auf einer extrazellulären Matrix keine Veränderung der Morphologie herbeiführte, aber die Lebensspanne von MSC verlängerte und die Proliferation erhöhte. Eine Analyse der Differenzierungsfähigkeit der auf ECM kultivierten Zellen zeigte, dass diese vollständig erhalten blieben, d.h. die MSC ihren Stammzellstatus nicht verloren haben. Matrigel führt je nach Zelltyp zu unterschiedlichen Zellantworten. Die Zellen in oder auf Matrigel verbinden sich miteinander und bilden dreidimensionale Strukturen aus, die ähnlich zu denen der Zellen im Ursprungsgewebe sind [Kleinman et al., 2005]. In dieser Arbeit konnte nicht genau festgestellt werden, ob Matrigel eine Differenzierung einleitet oder nur die Proliferation erhöht. Die Ergebnisse schwankten von ASC mit unveränderter Morphologie bis hin zu deutlichen Veränderungen. In einem Großteil der Versuche lagerten sich ASC in Matrigel zusammen und bildeten tubulusartige Strukturen aus, was auf eine Induktion der epithelialen Differenzierung durch Matrigel hinwies. Eine Erhöhung der epithelialen Marker CK18 und ZO-1 konnten auf der Proteinebene aber nicht nachgewiesen werden. Die Schwankungen in dem Einfluss von Matrigel könnten durch die heterogene Zusammensetzung der ASCs bedingt gewesen sein. Die Verwendung von konditionierten Medien könnte den induzierenden Einfluss von Matrigel zusätzlich unterstützen und in die richtige Richtung weisen. Bei der Betrachtung der Regulation von wnt-1 (neuroektodermale Differenzierung) und BMP-4 (mesodermale Differenzierung) während der Differenzierung in die jeweiligen Zelltypen konnten Integrin-abhängige Mechanismen nachgewiesen werden [Czyz et al., 2001]. Insgesamt bestimmte eine Kombination aus löslichen Faktoren und den Kontakten zu der extrazellulären Matrix die Differenzierung [Czyz et al., 2001]. Um Baby Maus Nierenepithelzellen in Tubuli zu differenzieren, war Hormon definiertes serumfreies Medium in der Kombination auf Matrigel oder Wachstumsfaktoren reduziertes Matrigel plus EGF oder TGF α notwendig [Taub et al., 1990]. Die Zusammensetzung von Matrigel entspricht mit Laminin, Collagen IV und Entactin der einer typischen epithelialen Basalmembran, wobei der Hauptanteil des Matrigels Laminin ist. Das Matrigel geliert bei RT und bildet so pur einen unveränderten Untergrund für die Zellkultur. Zusätzlich enthält es noch Wachstumsfaktoren, wie bFGF (0- 0,1pg/ml), EGF (0.5 - 1.3ng/ml); IGF-1 (15.6ng/ml), PDGF (12pg/ml), NGF (< 0.2ng/ml) und TGF- β (2.3ng/ml).

Ohne die zusätzlich zu den strukturellen Bestandteilen wie Laminin im Matrigel enthaltenen Faktoren wurde keine Tubulogenese initiiert [Taub et al., 1990]. Die extrazelluläre Matrix benötigte also zusätzlich Wachstumsfaktoren, um die epitheliale Differenzierung einzuleiten. Im Allgemeinen produzieren Zellen *in vitro* ihre eigene extrazelluläre Matrix. Diese wird meistens mit den Zellen zusammen entfernt, da die Zellen ihre ECM zwischen den Zellen und der Zellkulturoberfläche sezernieren. Die von Tubuluszellen sezernierte Matrix war sehr dünn, aber die Zellen konnten vollständig losgelöst werden und hinterließen eine optisch nachweisbare Matrix. Es könnte spekuliert werden, dass bei der Entfernung der Tubuluszellen auch die gebundenen Wachstumsfaktoren gelöst wurden oder nur noch in einem verringerten Maß vorhanden waren. Dadurch könnte die fehlende induktive Wirkung der extrazellulären Matrix aus Tubuluszellen erklärt werden. Unterstützt wird diese Theorie durch die Erhöhung des epithelialen Markers CK18 bei der Zugabe von Wachstumsfaktoren oder besonders von ATRA auf der Proteinebene. Morphologisch führte die Beschichtung mit einer dünnen Schicht Matrigel, wie bei der dreidimensionalen Kultur auch, zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Unveränderte ASC und tubulusartige Anordnungen der Zellen traten auf. Die Ursache hierfür könnte an einer Variabilität zwischen den Zellaufreinigungen liegen, da die Kultur- und Isolations-bedingungen der ASCs gleich gehalten wurden. Wenn das Matrigel zum Medium hinzugefügt wurde, stieg die Expression von CK18 und ZO-1 an, besonders bei der Kultur mit konditioniertem Medium. In der Immunfluoreszenz konnten bei einigen Ansätzen Anfänge einer Differenzierung erkannt werden, was durch nicht durchgängige Abgrenzungen mit ZO-1 an den Zellgrenzen gezeigt wurde. Im Western Blot konnte keine erhöhte Expression der epithelialen Marker festgestellt werden. Die Verwendung von konditioniertem Medium zusätzlich zum Matrigel rief eine markantere Anordnung tubulusartiger Strukturen bei den ASC hervor, was darauf deutete, dass die Zellen in die epitheliale Richtung differenzierten. Die Anwendung einer dünnen Schicht Matrigel führte auf der Proteinebene unabhängig von der eingesetzten Matrigelkonzentration nicht zu einer erhöhten Expression von CK18 und ZO-1. Auf der RNA Ebene hingegen zeigte sich eine Veränderung der Expression. Auch hier führte die Anwendung von konditioniertem Medium zu einer stärker erhöhten Expression der untersuchten Marker. Einheitlich lässt sich für die Matrigelversuche sagen, dass eine Kombination aus Matrigel und Medienfaktoren einen stärkeren Einfluss auf die Differenzierung der ASC hatten, als nur die Beschichtung alleine.

4.3. Einfluss der Co-Kultur von Tubuluszellen und Stammzellen

Als Co-Kultur wird eine Mischung aus zwei oder mehr verschiedenen Zellarten bezeichnet, die zusammen kultiviert werden. Co-Kulturen sollten in dieser Arbeit Aufschluss darüber geben, ob die zellulären Wechselwirkungen für eine Differenzierung der ASC in epitheliale Tubuluszellen wichtig oder sogar essentiell waren. Die zwei Varianten der Co-Kultur umfassen den direkten Zell-Zell-Kontakt und den bidirektionalen Effekt von zwei Zelltypen aufeinander, die durch eine Membran voneinander getrennt sind. Für die indirekte Co-Kultur wurden Membraneinsätze mit einer Porengröße von $3\mu\text{m}$ gewählt. Der Kontakt zwischen zwei Zelltypen wird hauptsächlich über sezernierte Faktoren ausgelöst. Bei einer Porengröße von $3\mu\text{m}$ könnte aber auch spekuliert werden, dass ein direkter Kontakt über Membranfortsätze stattfinden könnte. Während der embryonalen Entwicklung der Niere ist der Kontakt zwischen der Ureterknospe und dem metanephrischen Mesenchym notwendig für die Bildung von Tubuli, bei dem sich beide Gewebearten gegenseitig stimulieren [Saxén et al., 1987]. Die Ureterknospe kann aber *in vitro* auch ohne direkten Zellkontakt auf einer ECM und mit einigen löslichen Faktoren Verzweigungen entwickeln, benötigt in dieser Phase also keinen direkten Zell-Zell-Kontakt. Für die weitere Entwicklung von Richtung und Verlängerung könnte direkter Kontakt allerdings wichtig sein [Qiao et al., 1999]. Shu et al. [2006] zeigten die Differenzierung von MSC aus Ratten in epitheliale Vorläuferzellen, indem diese auf einer permeablen Membran kultiviert wurden, wobei eine vollständige Differenzierung durch das Fehlen typischer Ionenkanäle aber ausgeschlossen wurde. Bei der indirekten Co-Kultur erfolgt die Aktivierung der Zellen über Differenzierungsfaktoren, die über das Medium ausgetauscht werden können. Vats et al. [2006] zeigten, dass humane ES in chondrogene Zellen differenzieren, wenn sie über Membraneinsätze getrennt, mit primären Chondrozyten kultiviert wurden. In dieser Studie wurde die indirekte Co-Kultur von Tubuluszellen proximalen oder distalen Ursprungs bzw. der Negativfraktion oder Nierengewebe mit ASC durchgeführt, was zu einer deutlich veränderten Morphologie der ASC führte. Die Zellen erschienen langgestreckter und schmaler, zusätzlich erhöhte sich die Proliferation der ASC. Die morphologische Veränderung konnte aber nicht durch die Expression von CK18 und ZO-1 bestätigt werden. Es ist möglich, dass die beiden Marker zu diesem Zeitpunkt noch nicht exprimiert waren. Die zusätzliche Zugabe von ATRA zu den Kulturen mit Tubuluszellen in den Membraneinsätzen führte zu einer höheren CK18 Expression als die indirekte Co-Kultur. Bei den Versuchen mit Nierengewebe könnte auch ein Problem durch die längere Kultur des Gewebes entstanden sein, wobei apoptotische Faktoren

gebildet werden könnten. Bei Verletzung der Tubuluszellen werden vermehrt Faktoren gebildet, die *in vivo* einen Reparaturmechanismus einleiten würden. Eine Verletzung der Tubuluszellen könnte die Sezernierung spezifischer Faktoren für die Reparatur und somit auch mesenchymaler zu epithelialer Transformation einleiten [Anglani et al., 2008]. Das zugrunde liegende Prinzip basiert auf dem Reparaturmechanismus der Epithelzellen bei Verletzungen der Niere. Nach Ischämie oder Verletzungen von Nierenzellen regenerieren sich die Tubuli mit der Zeit. Obwohl noch nicht ganz geklärt ist, welchen Ursprung die Zellen für die epitheliale Regeneration haben, werden die normale Struktur und Funktion wiederhergestellt [Lin et al., 2005]. Dedifferenzierung der Zellen in der Niere konnte durch verschiedene Marker (z.B. Vimentin), Elongation der Zellen oder den Verlust der apikal-basalen Polarität nachgewiesen werden. Bei einer Redifferenzierung wurde die epitheliale Morphologie wiederhergestellt [Hallman et al., 2008]. Diese Signale sollten nach der Theorie auch ASC in der indirekten Co-Kultur in die epitheliale Richtung differenzieren. Eine Verletzung der Tubuluszellen sollte die Sezernierung von Faktoren initiieren, die für die Regeneration benötigt wurden. *In vitro* kann eine Verletzung der Zellen z.B. durch H_2O_2 verursacht werden. Deshalb wurde untersucht, ob eine mittels H_2O_2 simulierte Verletzung der Tubuluszellen die Sezernierung von regenerierenden Faktoren zur Differenzierung von ASC in Tubuluszellen anregen könnte. Die indirekte Co-Kultur mit verletzten Tubuluszellen zeigte allerdings keine Beeinflussung der Differenzierung von ASC in epitheliale Zellen. Möglicherweise waren die Tubuluszellen durch die Behandlung mit H_2O_2 zu stark geschädigt, um eine ausreichende Menge an induzierenden Faktoren zu sezernieren.

Andere Forschungsergebnisse wiesen darauf hin, dass der direkte Zell-Zell-Kontakt für die Differenzierung von MSC eine große Rolle spielt und Wachstumsfaktoren dafür nicht ausreichen. Ball et al. [2004] zeigten, dass der direkte Zellkontakt mit bereits ausdifferenzierten Zellen der kritische Parameter bei der Differenzierung von MSC in kleinere Blutgefäße und Bindegewebe darstellte. Bei einem direkten Vergleich von konditioniertem Medium, indirekter und direkter Co-Kultur bei Verwendung von Ratten MSC, konnte nur die direkte Co-Kultur eine Differenzierung in Kardiomyozyten und glattmuskuläre Zellen auslösen [Wang et al., 2006]. Auch in meiner Arbeit konnten sehr gute Ergebnisse für die Differenzierung von ASC gezeigt werden. Der Marker CD90, der auf ASC stark exprimiert wird, wurde signifikant reduziert, während der epitheliale Marker CK18 signifikant verstärkt exprimiert wurde. Der Einfluss von zusätzlich untersuchten Medienzusätzen (ATRA; ATRA, ActA und BMP-7) war dagegen gering. Daraus lässt sich schließen, dass der direkte Zell-Zell-Kontakt für die Differenzierung von ASC in die epitheliale Richtung mindestens ebenso

wichtig ist wie lösliche Faktoren. Da zuvor aber auch schon gezeigt werden konnte, dass sowohl lösliche Faktoren als auch Matrigel, also eine Form der extrazellulären Matrix, die Differenzierung beeinflussen können, umfasst die ideale Methode zur epithelialen Differenzierung wohl eine Kombination aus allen drei Elementen. Dies würde der Situation *in vivo* auch am nächsten kommen.

4.4. Untersuchungen zur Reduzierung der Heterogenität von Stammzellen aus Fettgewebe

ASC sind eine heterogene Population von Zellen, was sich u. a. durch die Gewinnung der Zellen begründet. Fettgewebe besteht hauptsächlich aus ausgereiften Adipozyten, Bindegewebe, ASC, von Blut ausgehende Zellen, glattmuskuläre Zellen, Perizyten und vaskuläre Zellen wie z.B. endotheliale Zellen [Yoshimura et al., 2006]. Adipozyten nehmen dabei ungefähr 2/3 der Gesamtzellzahl bzw. mehr als 90% des Gesamtvolumens ein [Van Hamelen et al., 2005]. Die Ausbeute an ASC variiert zwischen den Isolationen und ist abhängig von den Donoren, Region der Liposuktion, Aufbewahrungszeit und der Isolationsmethode, um nur einige Faktoren zu nennen [Aust 2004, Bakker 2004, Heimbürg 2004]. Das Profil an Oberflächenmarker verändert sich bei ASC über die Zeit. Für ASC typische Marker wie CD73, CD105 oder CD166, sind zu Beginn der Kultur nur gering exprimiert und nehmen mit der Kulturzeit und den Passagen zu. Andere Marker wie CD146 oder CD34 nehmen mit der Zeit ab oder verschwinden ganz [Mitchell et al., 2006; Varma et al., 2007]. Zuk et al. [2001] haben festgestellt, dass ASC negative für CD31 und CD34 sind. Die Aussagen bezüglich der Expression von CD34 widersprechen sich also. In dieser Arbeit konnte die Expression von CD34 in geringen Mengen mit durchschnittlich unter 10% nachgewiesen werden. Vor der Selektion der ASCs über die Adhärenz zu Plastik werden die Zellen als stroma-vaskuläre Fraktion (SVF) bezeichnet, die eine sehr heterogene Population von Mastzellen, endothelialen Zellen, Perizyten, Fibroblasten, Differenzierungslinien spezifischen Vorläuferzellen und Preadipozyten darstellt. Häufig wird bereits diese Zellmischung in der regenerativen Medizin oder im Tissue Engineering eingesetzt [Quelle: laufende klinische Studien ClinicalTrials.gov, Stand 11.01.2010]. ASC sind im Vergleich schon homogener, haben aber immer noch eine Kontamination an endothelialen Zellen, Perizyten und glattmuskulären Zellen [Zuk et al., 2001]. Das Expressionsprofil $CD31^{-}/CD34^{-}/CD146^{+}$ deutet auf Perizyten hin, $CD31^{-}/CD34^{+}/CD146^{+}$ Zellen auf Vorläuferzellen der Perizyten. Im Allgemeinen werden MSC über die Zeit in Kultur homogener [Mageed et al.,

2007; Mitchell et al., 2006]. Außerdem ändert sich die Morphologie der MSC. Mit der Zeit in Kultur werden die MSC größer [Aslan et al., 2006]. Dieses Phänomen war auch bei den ASC aus meinen Isolationen aufgefallen. Die Zellen wurden mit den Passagen größer und runder, d.h. hatten ein weniger fibroblastenartiges Erscheinungsbild. Wie schnell sich die ASC veränderten, hing von der Isolation ab und schwankte stark. Im Allgemeinen waren die Zellen nach der fünften Passage deutlich vergrößert, weshalb die Versuche daher nicht mehr mit Zellen nach der fünften Passage durchgeführt wurden. Außerdem wurde durch die größeren Zellen die Ausbeute pro Kulturflasche mit steigender Passage geringer, da diese mehr Platz benötigten und die Zellen nicht bis zur Konfluenz kultiviert wurden.

Die Heterogenität der ASCs könnte ein Problem darstellen, da nur ein Teil der Zellen die Charakteristika von Stammzellen trägt und differenzieren kann. Dadurch könnte die Effizienz der Differenzierung für die Anwendung in der regenerativen Medizin stark reduziert werden. Ein simpler Waschschrift mit NaCl 60 Minuten nach Kulturbeginn kann die Heterogenität der ASCs reduzieren. Die Analyse einiger typischer Oberflächenmarker wie CD29, CD44, CD49a, CD73, CD90, CD105 und CD166 in der Durchflusszytometrie hat ergeben, dass die gewaschenen Zellen nach sechs Passagen eindeutig höher exprimiert waren als dieselben Marker bei den nach der Standardmethode isolierten Zellen. Statistisch war dies allerdings nicht signifikant. Zusätzlich wurden die Marker CD31, CD34, CD146, Desmin und glattnuskuläres Aktin (smA) getestet. CD31 ist ein endothelialer Marker, der auf ASC exprimiert werden kann, aber nicht immer exprimiert ist. Die Expression schwankt stark zwischen verschiedenen Isolationen [Mitchell et al., 2006; Varma et al., 2007]. Bei meinen Versuchen bestätigte sich dieses Ergebnis. CD31 wurde in der Passage 2 von den Standard isolierten Zellen noch gering exprimiert, bei den gewaschenen Zellen und in der Passage 6 wurde CD31 nur in einer von fünf Isolationen in sehr geringem Ausmaß exprimiert. Obwohl CD34 ein Marker für hämatopoetische Stammzellen ist, ist er in frühen Passagen auch auf ASC exprimiert [McIntosh et al., 2006]. Andere konnten zeigen, dass CD34 aber nicht auf mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark exprimiert wird [Pittenger et al., 1999]. Die Expression auf ASC nimmt mit der Zeit in Kultur ab, bis der Marker nur noch in sehr geringem Maße nachweisbar ist [Mitchell et al., 2006]. In meiner Arbeit konnte festgestellt werden, dass CD34 in gewaschenen Zellen weniger exprimiert wurde als in den Standard isolierten Zellen, was auf eine geringere Kontamination mit hämatopoetischen Zellen schließen ließ. Insgesamt war die Expression aber über die Zeit nicht verändert, was vielleicht an der ohnehin schon geringen Expression gelegen haben könnte.

Das myeloma Zelladhäsionsmolekül CD146 ist im Allgemeinen in ASC nur gering exprimiert und reduziert sich ebenfalls mit der Zeit in Kultur [Mitchell et al., 2006]. CD146 ist ein Marker für endotheliale Zellen und Perizyten, wodurch er einer bestimmten Fraktion der ASC zugeordnet werden kann. Die Verringerung der Expression mit der Zeit kann somit auf der Verminderung eben dieser Zellen im Verhältnis zu der Gesamtzahl der ASCs beruhen, oder aber auf einer Änderung des Expressionsverhaltens der Zellen in Kultur zurückgeführt werden. Meine Daten ließen nur bei den Standard isolierten Zellen eine Abnahme mit der Zeit in der Kultur erkennen, während die gewaschenen Zellen eine Erhöhung der Expression von CD146 zeigten. Die Expression war insgesamt ($p2$ gewaschene Zellen = 5,43 %; $p2$ Standard Zellen = 3,73 %) sehr gering und die Veränderungen waren nicht statistisch signifikant. Desmin und smA waren in den gewaschenen Zellen deutlich geringer exprimiert als in den Standard isolierten Zellen, was sich in der qPCR als signifikant erwiesen hat.

Auf RNA Ebene wurden oct4, sall1 and six2, sowie Nestin, Desmin und smA untersucht. Desmin kodiert ein muskelspezifisches Intermediärfilament und gilt vor allem als herzspezifischer Marker. Es konnte in niedriger Menge in ASC nachgewiesen werden, was u.a. gut in der Immunfluoreszenz dargestellt werden konnte. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass auch doppelt positive Zellen für Desmin und smA in den ASC vorkommen, was wiederum auf einen anderen Zelltyp hindeutet (Immunfluoreszenztest). Ebenso gibt es einige Zellen, bei denen nur smA exprimiert wurde und die deutlich häufiger auftraten als Desmin oder doppeltpositive Zellen. Da die Anzahl der Desmin positiven Zellen sehr gering war, war es leider nicht möglich eine aussagekräftige Zellzählung im Immunfluoreszenztest über die Anteile der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl zu machen. Dies machte den Vergleich von gewaschenen und Standard isolierten Zellen ebenfalls unmöglich. Bei der qPCR konnte dann aber nachgewiesen werden, dass Desmin und smA in den gewaschenen Zellen signifikant reduziert gegenüber der Kontrolle von Standard isolierten ASC waren. Daraus kann geschlossen werden, dass der Anteil der smA bzw. Desmin positiven Zellen durch den Waschschrift dezimiert wurde, diese Zellen also erfolgreich reduziert werden konnten. Nestin ist ein Intermediärfilament, das in Stammzellen exprimiert ist und sollte daher bei einer reduzierten Heterogenität der ASCs erhöht sein. Oct4, sall1 und six2 sind Transkriptionsfaktoren, die mit mesenchymalen Stammzellen assoziiert werden. Oct4 dient also als Stammzellmarker und spielt eine Rolle in der Regulierung von Pluripotenz, während six2 und sall1 mit mesenchymalen Vorläuferzellen in der Entwicklung der Niere in Verbindung gebracht werden [Nishinakamura, 2008; Self et al., 2006]. Die Analyse auf RNA Ebene zeigte signifikante Unterschiede zwischen Standard isolierten und gewaschenen ASC,

wobei Nestin, oct4 und sall1 höher in den gewaschenen Zellen exprimiert wurden. Die Expression von six2 war hingegen geringer. Six2 ist ein Stammzellmarker in der Niere, der im mesenchymalen Metanephros exprimiert wird. Es wird vermutet, dass six2 bei der Entwicklung der Niere dazu vorhanden ist, die mesenchymalen Vorläuferzellen in einem undifferenzierten Zustand zu halten. Um dies zu erreichen, neutralisiert six2 die induktiven Signale von der Ureterknospe. Six2 ist Teil eines genetischen Mechanismus. Dieser Mechanismus wirkt der epithelialen Polarisation entgegen und reguliert die Erneuerung von renalen epithelialen Vorläuferzellen, indem der undifferenzierte Zustand der mesenchymalen Vorläufer erhalten bleibt [Self et al., 2006]. Der Rückgang der Expression von Desmin und α -smA in Verbindung mit der erhöhten Expression von den Stammzell-assoziierten Transkriptionsfaktoren lässt den Schluss zu, dass die ASC durch den Waschschritt homogener geworden sind. Diese einfache und unaufwendige Methode zur Reduktion der Heterogenität ist also effektiv.

Es wurde auch noch ein anderer Ansatz zur Aufreinigung von ASC untersucht. Dieser basiert auf einer Selektion nach Oberflächenmarkern, die eindeutig den ASC zugeordnet werden können bzw., bei einer negativen Selektion, nicht auf ASC exprimiert werden. Am häufigsten wird die immunomagnetische Selektion angewendet, es sind aber auch durchflusszytometrische Anwendungen durchgeführt worden. Die Isolation nach CD49a, CD105, CD271 und CD34 ist bereits in der Literatur beschrieben worden. Eine Studie von Suga et al. [2009] verglich $CD34^+$ und $CD34^-$ Fraktionen von ASC. Die beiden Fraktionen unterschieden sich in ihrer Proliferation, Kolonie-bildende Einheit (CFU) und der Fähigkeit zur Differenzierung. $CD34$ positive Zellen proliferierten stärker und hatten eine höhere Rate an CFU, während die $CD34$ negative Fraktion besser in adipogene und osteogene Zellen differenzieren konnten. Eine Analyse der Marker zeigte, dass $CD34^+$ Zellen endotheliale Marker wie die VEGF Rezeptoren Flk1 und FLT1 exprimierten und $CD34^-$ Zellen typische Marker für Perizyten wie CD146 und α -smA. Der Verlust von CD34 über die Zeit ist also vielleicht auf die Festlegung oder die Differenzierung der ASCs zurückzuführen. Die Aufreinigung nach CD49a soll einen homogenen Immunphänotyp der $CD49a^+$ Zellen hervorbringen, wobei CD90 und CD105 stärker und CD146 geringer exprimiert wurden. Diese Zellfraktion zeigte ein erhöhtes Zellwachstum und konnte in unterschiedliche Zelltypen differenzieren [Rider et al., 2007]. Ähnliche Ergebnisse sind von $CD105^+$ Zellen bekannt. Banas et al. [2007] haben für diese Zellen ebenfalls eine homogenere Morphologie sowie eine gesteigerte Proliferation nachgewiesen. Nach der Isolation nach CD105 kommen in der Positivfraktion keine $CD34^+$ Zellen mehr vor [Aslan et al., 2006]. Die Aufreinigungen

zeigten, dass MSC durch die immunomagnetische Isolation ein homogeneres Bild erhielten, was sich im Falle der CD105⁺ Fraktion auch auf eine Steigerung der Proliferation auswirkte [Banas et al., 2007]. Bei der Isolation nach CD271 stellte sich ein etwas anderes Bild dar; die CD271⁺ Zellen hatten die gleiche heterogene Morphologie wie nicht selektierte MSC. Hinzukommt, dass nur 50% der selektierten Zellen nach der Kultur positiv für CD271 waren [Horn et al., 2008]. Jarocha et al. [2008] berichtete hingegen, dass die CD271⁺ Fraktion die niedrigste hämatopoetische Kontamination aufwies. Des Weiteren ist die immunomagnetische Isolation nach CD31 von mehreren Gruppen genutzt worden, um CD31 positive Zellen zu eliminieren und so endotheliale Progenitorzellen zu entfernen [Hutley et al., 2001; Miranville et al., 2004; Sengenès et al., 2005]. Die Isolation nach den vier Markern CD49a, CD90, CD105 und CD271 brachte nicht eine annähernd so gute Reduktion der Heterogenität der ASCs wie der Waschschrift. Morphologisch waren kaum Unterschiede zu erkennen, nur die CD90⁺ Fraktion hob sich mit einer erhöhten Proliferation von den anderen Fraktionen ab. Die CD90⁻ Fraktion proliferierte entsprechend geringer. Die Fähigkeit zur Differenzierung wurde dadurch aber nicht beeinflusst. Die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie und der qPCR wiesen hohe Schwankungen auf. Es konnten keine signifikanten Änderungen in der Expression der Oberflächenmarker festgestellt werden, außerdem waren die Stammzellgene nicht erhöht exprimiert, wobei die hohe Standardabweichung eine statistische Auswertung erschwerte. Eine statistische Erhöhung von *six2* konnte in der CD271⁻ Fraktion nachgewiesen werden, was für sich alleine genommen jedoch nicht aussagekräftig war. Hinzukommt, dass die niedrige Ausbeute an Zellen bei der immunomagnetischen Isolation einen Einsatz in der regenerativen Medizin erschwert bzw. zeitlich stark verzögert. Eine lange Kultur von ASC wäre für die medizinische Verwendung ungeeignet, da zu viele Störfaktoren auftreten könnten. Da die Ausbeute bei der Anwendung des Waschschrifts deutlich höher war und zusätzlich ein Rückgang der Heterogenität gezeigt werden konnte, ist diese Anwendung mehr zu empfehlen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Waschschrift eine Stunde nach der Isolation die Stammzellmarker Nestin, oct4 und *sall1* signifikant erhöhte. Zusammen mit der signifikanten Reduktion von Desmin und *smA* deutet dies auf eine reinere ASC Population hin. Die gewaschenen ASC waren weniger heterogen als die nach dem Standardprotokoll isolierten Zellen. Daher ist ein Waschschrift nach einer Stunde eine einfache und effiziente Methode, um die Heterogenität der ASCs zu verringern.

5. Zusammenfassung/Ausblick

Mesenchymale Stammzellen (MSC) rücken in der regenerativen Medizin und im Tissue Engineering immer mehr in den Vordergrund. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen bergen sie keine ethischen Probleme und sind leicht zu isolieren. Die ursprünglich aus Knochenmark gewonnenen MSC können inzwischen aus vielen verschiedenen Quellen wie Nabelschnurblut [Kern et al. 2006], Dentalgewebe [Huang et al., 2009], Plazenta [Huang et al., 2009], Haut [Salvolini et al., 2009] und aus Fettgewebe isoliert werden [Zuk et al., 2001]. Der Immunphänotyp variiert zwischen den aus verschiedenen Quellen gewonnenen MSC nur gering. Die Gewinnung aus Fettgewebe hat den Vorteil, dass eine minimal invasive Prozedur und eine hohe Ausbeute zusammenkommen. Die Stammzellen aus Fettgewebe (ASC) können in der Therapie eingesetzt werden und zu der Regeneration von Geweben nach Verletzungen beitragen [Wong et al., 2008; Poulsom et al., 2001]. Der genaue Mechanismus mit dem die Stammzellen wirken ist allerdings noch nicht geklärt. Sowohl die Integration der MSCs in das Gewebe als auch ein rein parakriner Einfluss wurden nachgewiesen. Klar ist nur, dass ein positiver Effekt von einer Therapie mit MSC ausgeht [Mizuno et al., 2009]. *In vivo* sind Zellen verschiedenen Einflüssen ausgesetzt, die den Zustand einer Zelle bestimmen. Lösliche Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Hormone oder Vitamine wirken dabei ebenso wie die extrazelluläre Matrix und Zell-Zell-Kontakte auf die Zelle ein, die mit Wachstum, Zellform, Differenzierung oder Ähnlichem antwortet. In meiner Arbeit wurden daher drei unterschiedliche Ansätze für die *in vitro* Differenzierung von ASC in epitheliale Tubuluszellen untersucht: (1) die Wirkung von löslichen Faktoren, die dem Medium zugesetzt wurden, (2) der Einfluss der extrazellulären Matrix aus zum einen Tubuluszellen und zum anderen Matrigel und (3) die Co-Kultur, bei der auch direkter Zell-Zell-Kontakt untersucht wurde. Damit, und mit einer Kombination der einzelnen Bereiche, sollte das natürliche Umfeld der Tubuluszellen simuliert werden und epitheliale Differenzierung initiieren. Die Zugabe von ATRA, ActA und BMP-7 führte zu einer Differenzierung in die epitheliale Richtung, während die extrazelluläre Matrix aus Tubuluszellen nicht dafür ausreichte. Matrigel hingegen, konnte besonders in der Verbindung mit konditioniertem Medium eine Differenzierung induzieren. Die indirekte Co-Kultur über Membraneinsätze, über die u. a. der parakrine Einfluss der Tubuluszellen untersucht werden sollte, führte zu morphologischen Veränderungen der ASC, die aber nicht mit den hier verwendeten epithelialen Markern nachgewiesen werden konnte. Der direkte Zell-Zell-Kontakt zeigte eine Reduktion des

Oberflächen Markers CD90 verbunden mit einer Erhöhung der Expression von CK18. Die Differenzierung von ASC in epitheliale Zellen ist also auf drei verschiedenen Wegen möglich. Zwischen verschiedenen Isolationen von ASC traten hohe Schwankungen bezüglich der Expression von Oberflächenmarkern und Proliferation auf, was auch einen Einfluss auf die Differenzierung haben könnte. Ein Grund dafür könnte die Heterogenität von ASC sein. Zur Reduzierung dieser wurden daher ein Waschschrift eine Stunde nach Kulturbeginn und eine immunomagnetische Isolation mit CD49a, CD90, CD105 oder CD271 durchgeführt. Die immunomagnetische Aufreinigung führte nur zu einer leichten Verbesserung der Heterogenität, aber zu einer sehr geringen Zellausbeute. Für den Waschschrift konnte gezeigt werden, dass die Expression der Stammzellmarker Nestin, oct4 und sall1 signifikant erhöht und Desmin und smA Expression reduziert wurden, was auf eine Reduktion der Heterogenität hindeutete. Der zusätzliche Waschschrift kann also schnell und unkompliziert die Heterogenität der ASC reduzieren.

Die Differenzierung von ASC in epitheliale Tubuluszellen durch den Einfluss von Zell-Zell-Kontakten zeigt vielversprechende Ansätze und sollte weiter verfolgt werden. Eine verlängerte Kulturdauer sollte dabei angestrebt werden, da auch die adipogene Differenzierung zumeist erst nach 14 bis 21 Tagen nachweisbar war. Dafür müsste die Markierung mit CellTracker länger nachweisbar sein. Eine Inhibierung der Proliferation könnte die Grundlage dazu liefern. Um den Stand der Differenzierung in die epitheliale Richtung nachzuweisen, könnten andere epitheliale Marker, Ionenkanäle, die erst spät in den Tubuluszellen angelegt werden, und funktionelle Mechanismen untersucht werden. Das Zusammenspiel der verschiedenen Einflüsse auf die Zelle könnte ebenfalls noch genauer untersucht werden. Für die Regenerative Medizin ist es aus Gründen der GMP sinnvoller, die Zellen nur mit dem Zusatz an löslichen Faktoren zu differenzieren. Der Ansatz mit ATRA, ActA und BMP-7 scheint sehr vielversprechend zu sein und könnte in dieser Hinsicht weiter ausgebaut werden.

6. Summary

In regenerative medicine and tissue engineering, mesenchymal stem cells (MSC) get more and more in the focus. Originally obtained from bone marrow, MSC are now derived from different tissues, showing only small differences in immunophenotype or differentiation potential. Fatty tissue is easily accessible with a minimal invasive procedure, leading to a high amount of MSC. These adipose derived stem cells (ASC) have the same marker panel, differentiation capability and adherence to plastic as bone marrow derived MSC. In earlier studies it was believed, that MSC can only differentiate in celltypes of mesodermal origin as adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. Recently, those limitations were disproved as the differentiation into hepatocytes [Banas et.al., 2007; Lange et al., 2006], neural [Krampera et al., 2006], endothelial [Cao et al., 2005], and epithelial cells [Brzoska et al., 2005] was shown. Acute kidney injury is mostly regulated by self-repair, but in some cases patients do not recover. Regenerative medicine using ASC might be a solution for the treatment of kidney injuries. It could already be proven that the use of stem cells can positively influence regeneration [Chen et al., 2004; Tögel et al., 2005].

In vivo a cell is defined through many different influences like a multitude of soluble factors (growth factors, cytokines, hormones and vitamins), as well as the extracellular matrix and cell-cell-contact. My thesis investigates therefore three different ways, which might possibly lead to an epithelial differentiation of ASC: (1) the addition of growth factors and cytokines to the culture medium, (2) the influence of extracellular matrix both derived from tubular cells and Matrigel, and (3) indirect and direct cell-cell-contact.

It could be shown that a combination of all-trans retinoic acid, activin A and BMP-7 significantly enhanced the expression of the epithelial markers cytokeratin 18 and zona occludens 1, while the extracellular matrix derived from tubular cells did not change this markers on ASC. However, for the differentiation into epithelial cells, direct cell contact showed also a good prospect to induce differentiation of ASC. Meanwhile, culture on Matrigel might change the ASC into epithelial direction depending on the cells, which display a great heterogeneity coming from different donors and thus different isolations. Since ASC are a heterogeneous mixture of cells, which could influence the differentiation potential, an attempt was made to reduce the heterogeneity by an additional washing step and immunomagnetic isolation by CD49a, CD90, CD105 or CD271. A washing step after one hour proved to reduce the heterogeneity of ASC and was more effective than immunomagnetic isolation with a much higher cell yield.

7. Referenzen

- Alvarez, P. D.; Garcia-Arranz, M.; Georgiev-Hristov, T.; Garcia-Olmo, D. A New Bronchoscopic Treatment of Tracheomediastinal Fistula Using Autologous Adipose-Derived Stem Cells. *Thorax* 2008, 63, 374-376.
- Anglani, F.; Ceol, M.; Mezzabotta, F.; Torregrossa, R.; Tiralongo, E.; Tosetto, E.; Del Prete, D.; D'Angelo, A. The Renal Stem Cell System in Kidney Repair and Regeneration. *Front Biosci.* 2008, 13, 6395-6405.
- Ashjian, P. H.; Elbarbary, A. S.; Edmonds, B.; DeUgarte, D.; Zhu, M.; Zuk, P. A.; Lorenz, H. P.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H. In Vitro Differentiation of Human Processed Lipoaspirate Cells into Early Neural Progenitors. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003, 111, 1922-1931.
- Aslan, H.; Zilberman, Y.; Kandel, L.; Liebergall, M.; Oskouian, R. J.; Gazit, D.; Gazit, Z. Osteogenic Differentiation of Noncultured Immunoisolated Bone Marrow-Derived CD105+ Cells. *Stem Cells* 2006, 24, 1728-1737.
- Aust, L.; Devlin, B.; Foster, S. J.; Halvorsen, Y. D. C.; Hicok, K.; du Laney, T.; Sen, A.; Willingmyre, G. D.; Gimble, J. M. Yield of Human Adipose-Derived Adult Stem Cells From Liposuction Aspirates. *Cytotherapy* 2004, 6, 7-14.
- Baer, P. C.; Nockher, W. A.; Haase, W.; Scherberich, J. E. Isolation of Proximal and Distal Tubule Cells From Human Kidney by Immunomagnetic Separation. *Kidney International* 1997, 52, 1321-1331.
- Baer PC, Bereiter-Hahn J, Missler C et al. Conditioned medium from renal tubular epithelial cells initiates differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* 2009, 42:29-37.
- Baer PC, Schubert R, Bereiter-Hahn J et al. Expression of a functional epidermal growth factor receptor on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its signaling mechanism. *Eur J Cell Biol.* 2009, 88:273-283.
- Bakker, A. H.; Van Dielen, F. M.; Greve, J. W.; Adam, J. A.; Buurman, W. A. Preadipocyte Number in Omental and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Individuals. *Obes. Res.* 2004, 12, 488-498.
- Ball, S. G.; Shuttleworth, A. C.; Kielty, C. M. Direct Cell Contact Influences Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Fate. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004, 36, 714-727.

- Banas, A.; Teratani, T.; Yamamoto, Y.; Tokuhara, M.; Takeshita, F.; Quinn, G.; Okochi, H.; Ochiya, T. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells As a Source of Human Hepatocytes. *Hepatology* 2007, 46, 219-228.
- Battula, V. L.; Treml, S.; Bareiss, P. M.; Gieseke, F.; Roelofs, H.; de Zwart, P.; Muller, I.; Schewe, B.; Skutella, T.; Fibbe, W. E.; Kanz, L.; Buhning, H. J. Isolation of Functionally Distinct Mesenchymal Stem Cell Subsets Using Antibodies Against CD56, CD271, and Mesenchymal Stem Cell Antigen-1 (MSCA-1). *Haematologica* 2008.
- Bi, B.; Schmitt, R.; Israilova, M.; Nishio, H.; Cantley, L. G. Stromal Cells Protect Against Acute Tubular Injury Via an Endocrine Effect. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, 18, 2486-2496.
- Bi, Y. M.; Ehrichtiou, D.; Kilts, T. M.; Inkson, C. A.; Embree, M. C.; Sonoyama, W.; Li, L.; Leet, A. I.; Seo, B. M.; Zhang, L.; Shi, S. T.; Young, M. F. Identification of Tendon Stem/Progenitor Cells and the Role of the Extracellular Matrix in Their Niche. *Nature Medicine* 2007, 13, 1219-1227.
- Bruno, S.; Bussolati, B.; Grange, C.; Collino, F.; di Cantogno, L. V.; Herrera, M. B.; Biancone, L.; Tetta, C.; Segoloni, G.; Camussi, G. Isolation and Characterization of Resident Mesenchymal Stem Cells in Human Glomeruli. *Stem Cells Dev.* 2009, 18, 867-880.
- Brzoska, M.; Geiger, H.; Gauer, S.; Baer, P. Epithelial Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Adult Stem Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 330, 142-150.
- Burns, J. S.; Abdallah, B. M.; Guldberg, P.; Rygaard, J.; Schroder, H. D.; Kassem, M. Tumorigenic Heterogeneity in Cancer Stem Cells Evolved From Long-Term Cultures of Telomerase-Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Res.* 2005, 65, 3126-3135.
- Cao, Y.; Sun, Z.; Liao, L.; Meng, Y.; Han, Q.; Zhao, R. C. Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Differentiate into Endothelial Cells in Vitro and Improve Postnatal Neovascularization in Vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 332, 370-379.
- Chen, S. L.; Fang, W. W.; Ye, F.; Liu, Y. H.; Qian, J.; Shan, S. J.; Zhang, J. J.; Chunhua, R. Z.; Liao, L. M.; Lin, S.; Sun, J. P. Effect on Left Ventricular Function of Intracoronary Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Am. J. Cardiol.* 2004, 94, 92-95.

- Corre, J.; Barreau, C.; Cousin, B.; Chavoin, J. P.; Caton, D.; Fournial, G.; Penicaud, L.; Casteilla, L.; Laharrague, P. Human Subcutaneous Adipose Cells Support Complete Differentiation but Not Self-Renewal of Hematopoietic Progenitors. *J. Cell Physiol* 2006, 208, 282-288.
- Czyz, J.; Wobus, A. M. Embryonic Stem Cell Differentiation: The Role of Extracellular Factors. *Differentiation* 2001, 68, 167-174.
- da Silva, M. L.; Chagastelles, P. C.; Nardi, N. B. Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually All Post-Natal Organs and Tissues. *J. Cell Sci.* 2006, 119, 2204-2213.
- Davies, J. A.; Fisher, C. E. Genes and Proteins in Renal Development. *Experimental Nephrology* 2002, 10, 102-113.
- De Bari, C.; Dell'Accio, F.; Tylzanowski, P.; Luyten, F. P. Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. *Arthritis Rheum.* 2001, 44, 1928-1942.
- De Ugarte, D. A.; Morizono, K.; Elbarbary, A.; Alfonso, Z.; Zuk, P. A.; Zhu, M.; Dragoo, J. L.; Ashjian, P.; Thomas, B.; Benhaim, P.; Chen, I.; Fraser, J.; Hedrick, M. H. Comparison of Multi-Lineage Cells From Human Adipose Tissue and Bone Marrow. *Cells Tissues Organs* 2003, 174, 101-109.
- Deschaseaux, F.; Gindraux, F.; Saadi, R.; Obert, L.; Chalmers, D.; Herve, P. Direct Selection of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using an Anti-CD49a Antibody Reveals Their CD45med,Low Phenotype. *Br. J. Haematol.* 2003, 122, 506-517.
- Dicker, A.; Le Blanc, K.; Astrom, G.; van Harmelen, V.; Gotherstrom, C.; Blomqvist, L.; Arner, P.; Ryden, M. Functional Studies of Mesenchymal Stem Cells Derived From Adult Human Adipose Tissue. *Experimental Cell Research* 2005, 308, 283-290.
- Discher, D. E.; Mooney, D. J.; Zandstra, P. W. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science* 2009, 324, 1673-1677.
- Docheva, D.; Popov, C.; Mutschler, W.; Schieker, M. Human Mesenchymal Stem Cells in Contact With Their Environment: Surface Characteristics and the Integrin System. *J. Cell Mol. Med.* 2007, 11, 21-38.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* 2006, 8, 315-317.

- Dressler, G. R. The Cellular Basis of Kidney Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006, 22, 509-529.
- Esposito, M. T.; Di Noto, R.; Mirabelli, P.; Gorrese, M.; Parisi, S.; Montanaro, D.; Del Vecchio, L.; Pastore, L. Culture Conditions Allow Selection of Different Mesenchymal Progenitors From Adult Mouse Bone Marrow. *Tissue Eng Part A* 2009, 15, 2525-2536.
- Fang, B.; Song, Y.; Liao, L.; Zhang, Y.; Zhao, R. C. Favorable Response to Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease. *Transplant. Proc.* 2007, 39, 3358-3362.
- Feldman, G. J.; Mullin, J. M.; Ryan, M. P. Occludin: Structure, Function and Regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005, 57, 883-917.
- Fraser, J. K.; Schreiber, R.; Strem, B.; Zhu, M.; Alfonso, Z.; Wulur, I.; Hedrick, M. H. Plasticity of Human Adipose Stem Cells Toward Endothelial Cells and Cardiomyocytes. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2006, 3 Suppl 1, S33-S37.
- Fuchs, E.; Tumber, T.; Guasch, G. Socializing With the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. *Cell* 2004, 116, 769-778.
- Garcia-Olmo, D.; Garcia-Arranz, M.; Herreros, D.; Pascual, I.; Peiro, C.; Rodriguez-Montes, J. A. A Phase I Clinical Trial of the Treatment of Crohn's Fistula by Adipose Mesenchymal Stem Cell Transplantation. *Dis. Colon Rectum* 2005, 48, 1416-1423.
- Garcia-Olmo, D.; Garcia-Arranz, M.; Herreros, D. Expanded Adipose-Derived Stem Cells for the Treatment of Complex Perianal Fistula Including Crohn's Disease. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2008, 8, 1417-1423.
- Gimble, J. M.; Katz, A. J.; Bunnell, B. A. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ. Res.* 2007, 100, 1249-1260.
- Gronthos, S.; Franklin, D. M.; Leddy, H. A.; Robey, P. G.; Storms, R. W.; Gimble, J. M. Surface Protein Characterization of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *Journal of Cellular Physiology* 2001, 189, 54-63.
- Gupta, I. R.; Macias-Silva, M.; Kim, S.; Zhou, X.; Piscione, T. D.; Whiteside, C.; Wrana, J. L.; Rosenblum, N. D. BMP-2/ALK3 and HGF Signal in Parallel to Regulate Renal Collecting Duct Morphogenesis. *J. Cell Sci.* 2000, 113 Pt 2, 269-278.
- Hadley, M. A.; Byers, S. W.; Suarez-Quian, C. A.; Kleinman, H. K.; Dym, M. Extracellular Matrix Regulates Sertoli Cell Differentiation, Testicular Cord Formation, and Germ Cell Development in Vitro. *J. Cell Biol.* 1985, 101, 1511-1522.

- Hallman, M. A.; Zhuang, S.; Schnellmann, R. G. Regulation of Dedifferentiation and Redifferentiation in Renal Proximal Tubular Cells by the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008, 325, 520-528.
- Herrera, M. B.; Bussolati, B.; Bruno, S.; Fonsato, V.; Romanazzi, G. M.; Camussi, G. Mesenchymal Stem Cells Contribute to the Renal Repair of Acute Tubular Epithelial Injury. *Int. J. Mol. Med.* 2004, 14, 1035-1041.
- Ho, A. D.; Wagner, W.; Franke, W. Heterogeneity of Mesenchymal Stromal Cell Preparations. *Cytotherapy* 2008, 10, 320-330.
- Hopkins C, Li J, Rae F, Little MH. Stem cell options for kidney disease. *J Pathol.* 2009;217:265-281.
- Horn, P.; Bork, S.; Diehlmann, A.; Walenda, T.; Eckstein, V.; Ho, A. D.; Wagner, W. Isolation of Human Mesenchymal Stromal Cells Is More Efficient by Red Blood Cell Lysis. *Cytotherapy* 2008, 10, 676-685.
- Huang, G. T.; Gronthos, S.; Shi, S. Mesenchymal Stem Cells Derived From Dental Tissues Vs. Those From Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J. Dent. Res.* 2009, 88, 792-806.
- Huang, Y. C.; Yang, Z. M.; Chen, X. H.; Tan, M. Y.; Wang, J.; Li, X. Q.; Xie, H. Q.; Deng, L. Isolation of Mesenchymal Stem Cells From Human Placental Decidua Basalis and Resistance to Hypoxia and Serum Deprivation. *Stem Cell Rev.* 2009, 5, 247-255.
- Hutley, L. J.; Herington, A. C.; Shurety, W.; Cheung, C.; Vesey, D. A.; Cameron, D. P.; Prins, J. B. Human Adipose Tissue Endothelial Cells Promote Preadipocyte Proliferation. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 2001, 281, E1037-E1044.
- Imai, N.; Kaur, T.; Rosenberg, M. E.; Gupta, S. Cellular Therapy of Kidney Diseases. *Semin. Dial.* 2009, 22, 629-635.
- Insausti, C. L.; Blanquer, M.; Bleda, P.; Iniesta, P.; Majado, M. J.; Castellanos, G.; Moraleda, J. M. The Amniotic Membrane As a Source of Stem Cells. *Histol. Histopathol.* 2010, 25, 91-98.
- Iwashima, S.; Ozaki, T.; Maruyama, S.; Saka, Y.; Kobori, M.; Omae, K.; Yamaguchi, H.; Niimi, T.; Toriyama, K.; Kamei, Y.; Torii, S.; Murohara, T.; Yuzawa, Y.; Kitagawa, Y.; Matsuo, S. Novel Culture System of Mesenchymal Stromal Cells From Human Subcutaneous Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 2009, 18, 533-543.
- Jack, G. S.; Almeida, F. G.; Zhang, R.; Alfonso, Z. C.; Zuk, P. A.; Rodriguez, L. V. Processed Lipoaspirate Cells for Tissue Engineering of the Lower Urinary Tract:

- Implications for the Treatment of Stress Urinary Incontinence and Bladder Reconstruction. *J. Urol.* 2005, *174*, 2041-2045.
- Jarocha, D.; Lukasiewicz, E.; Majka, M. Advantage of Mesenchymal Stem Cells (MSC) Expansion Directly From Purified Bone Marrow CD105+ and CD271+ Cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2008, *46*, 307-314.
 - Jurgens, W. J.; Oedayrajsingh-Varma, M. J.; Helder, M. N.; Zandiehoulabi, B.; Schouten, T. E.; Kuik, D. J.; Ritt, M. J.; van Milligen, F. J. Effect of Tissue-Harvesting Site on Yield of Stem Cells Derived From Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Cell Tissue Res.* 2008, *332*, 415-426.
 - Kale, S.; Karihaloo, A.; Clark, P. R.; Kashgarian, M.; Krause, D. S.; Cantley, L. G. Bone Marrow Stem Cells Contribute to Repair of the Ischemically Injured Renal Tubule. *J. Clin. Invest* 2003, *112*, 42-49.
 - Kang, S. K.; Lee, D. H.; Bae, Y. C.; Kim, H. K.; Baik, S. Y.; Jung, J. S. Improvement of Neurological Deficits by Intracerebral Transplantation of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. *Exp. Neurol.* 2003, *183*, 355-366.
 - Karihaloo, A.; Nickel, C.; Cantley, L. G. Signals Which Build a Tubule. *Nephron Exp. Nephrol.* 2005, *100*, e40-e45.
 - Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Kluter, H.; Bieback, K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 2006, *24*, 1294-1301.
 - Kilroy, G. E.; Foster, S. J.; Wu, X.; Ruiz, J.; Sherwood, S.; Heifetz, A.; Ludlow, J. W.; Stricker, D. M.; Potiny, S.; Green, P.; Halvorsen, Y. D.; Cheatham, B.; Storms, R. W.; Gimble, J. M. Cytokine Profile of Human Adipose-Derived Stem Cells: Expression of Angiogenic, Hematopoietic, and Pro-Inflammatory Factors. *J. Cell Physiol* 2007, *212*, 702-709.
 - Kim, D.; Dressler, G. R. Nephrogenic Factors Promote Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Renal Epithelia. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005, *16*, 3527-3534.
 - Kispert, A.; Vainio, S.; McMahon, A. P. Wnt-4 Is a Mesenchymal Signal for Epithelial Transformation of Metanephric Mesenchyme in the Developing Kidney. *Development* 1998, *125*, 4225-4234.
 - Kleinman, H. K.; Philp, D.; Hoffman, M. P. Role of the Extracellular Matrix in Morphogenesis. *Current Opinion in Biotechnology* 2003, *14*, 526-532.

- Kleinman, H. K.; Martin, G. R. Matrigel: Basement Membrane Matrix With Biological Activity. *Seminars in Cancer Biology* 2005, 15, 378-386.
- Kolf, C. M.; Cho, E.; Tuan, R. S. Mesenchymal Stromal Cells. Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells: Regulation of Niche, Self-Renewal and Differentiation. *Arthritis Res. Ther.* 2007, 9, 204.
- Krampera, M.; Marconi, S.; Pasini, A.; Galie, M.; Rigotti, G.; Mosna, F.; Tinelli, M.; Lovato, L.; Anghileri, E.; Andreini, A.; Pizzolo, G.; Sbarbati, A.; Bonetti, B. Induction of Neural-Like Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow, Fat, Spleen and Thymus. *Bone* 2006.
- Kunter, U.; Rong, S.; Djuric, Z.; Boor, P.; Muller-Newen, G.; Yu, D. H.; Floege, J. Transplanted Mesenchymal Stem Cells Accelerate Glomerular Healing in Experimental Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006, 17, 2202-2212.
- Lange, C.; Bruns, H.; Kluth, D.; Zander, A. R.; Fiegel, H. C. Hepatocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Cocultures With Fetal Liver Cells. *World Journal of Gastroenterology* 2006, 12, 2394-2397.
- Lee, J. H.; Kemp, D. M. Human Adipose-Derived Stem Cells Display Myogenic Potential and Perturbed Function in Hypoxic Conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 341, 882-888.
- Lee, S. K.; Kim, Y.; Kim, S. S.; Lee, J. H.; Cho, K.; Lee, S. S.; Lee, Z. W.; Kwon, K. H.; Kim, Y. H.; Suh-Kim, H.; Yoo, J. S.; Park, Y. M. Differential Expression of Cell Surface Proteins in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Cultured With or Without Basic Fibroblast Growth Factor Containing Medium. *Proteomics*. 2009, 9, 4389-4405.
- Lendeckel, S.; Jodicke, A.; Christophis, P.; Heidinger, K.; Wolff, J.; Fraser, J. K.; Hedrick, M. H.; Berthold, L.; Howaldt, H. P. Autologous Stem Cells (Adipose) and Fibrin Glue Used to Treat Widespread Traumatic Calvarial Defects: Case Report. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2004, 32, 370-373.
- Lepperdinger, G.; Brunauer, R.; Jamnig, A.; Laschober, G.; Kassem, M. Controversial Issue: Is It Safe to Employ Mesenchymal Stem Cells in Cell-Based Therapies? *Exp. Gerontol.* 2008, 43, 1018-1023.
- Li, Z.; Guo, J.; Chang, Q.; Zhang, A. Paracrine Role for Mesenchymal Stem Cells in Acute Myocardial Infarction. *Biol. Pharm. Bull.* 2009, 32, 1343-1346.

- Lin, F.; Moran, A.; Igarashi, P. Intrarenal Cells, Not Bone Marrow-Derived Cells, Are the Major Source for Regeneration in Postischemic Kidney. *J. Clin. Invest* 2005, *115*, 1756-1764.
- Maeshima, A.; Maeshima, K.; Nojima, Y.; Kojima, I. Involvement of Pax-2 in the Action of Activin A on Tubular Cell Regeneration. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, *13*, 2850-2859.
- Mageed, A. S.; Pietryga, D. W.; DeHeer, D. H.; West, R. A. Isolation of Large Numbers of Mesenchymal Stem Cells From the Washings of Bone Marrow Collection Bags: Characterization of Fresh Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation* 2007, *83*, 1019-1026.
- Matsubara, T.; Tsutsumi, S.; Pan, H.; Hiraoka, H.; Oda, R.; Nishimura, M.; Kawaguchi, H.; Nakamura, K.; Kato, Y. A New Technique to Expand Human Mesenchymal Stem Cells Using Basement Membrane Extracellular Matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, *313*, 503-508.
- McIntosh, K.; Zvonic, S.; Garrett, S.; Mitchell, J. B.; Floyd, Z. E.; Hammill, L.; Kloster, A.; Halvorsen, Y. D.; Ting, J. P.; Storms, R. W.; Goh, B.; Kilroy, G.; Wu, X. Y.; Gimble, J. M. The Immunogenicity of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Vitro. *Stem Cells* 2006, *24*, 1246-1253.
- Miranville, A.; Heeschen, C.; Sengenès, C.; Curat, C. A.; Busse, R.; Bouloumie, A. Improvement of Postnatal Neovascularization by Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Circulation* 2004, *110*, 349-355.
- Mitchell, J. B.; McIntosh, K.; Zvonic, S.; Garretta, S.; Floyd, Z. E.; Kloster, A.; Di Halvorsen, Y.; Storms, R. W.; Goh, B.; Kilroy, G.; Wu, X. Y.; Gimble, J. M. Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *Stem Cells* 2006, *24*, 376-385.
- Mizuno, H.; Zuk, P. A.; Zhu, M.; Lorenz, H. P.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H. Myogenic Differentiation by Human Processed Lipoaspirate Cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2002, *109*, 199-209.
- Mizuno, H. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Repair and Regeneration: Ten Years of Research and a Literature Review. *J. Nippon Med. Sch* 2009, *76*, 56-66.
- Morigi, M.; Imberti, B.; Zoja, C.; Corna, D.; Tomasoni, S.; Abbate, M.; Rottoli, D.; Angioletti, S.; Benigni, A.; Perico, N.; Alison, M.; Remuzzi, G. Mesenchymal Stem Cells Are Renotropic, Helping to Repair the Kidney and Improve Function in Acute Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004, *15*, 1794-1804.

- Nemeth, M. J.; Bodine, D. M. Regulation of Hematopoiesis and the Hematopoietic Stem Cell Niche by Wnt Signaling Pathways. *Cell Res.* 2007, 17, 746-758.
- Neuville, P.; Yan, Z. Q.; Gidlof, A.; Pepper, M. S.; Hansson, G. K.; Gabbiani, G.; Sirsjo, A. Retinoic Acid Regulates Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation and Phenotypic Features in Vivo and in Vitro Through an RAR Alpha-Dependent Signaling Pathway. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999, 19, 1430-1436.
- Nishinakamura, R. Stem Cells in the Embryonic Kidney. *Kidney Int.* 2008, 73, 913-917.
- Oedayrajsingh-Varma, M. J.; van Ham, S. M.; Knippenberg, M.; Helder, M. N.; Klein-Nulend, J.; Schouten, T. E.; Ritt, M. J. P. F.; van Milligen, F. J. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Yield and Growth Characteristics Are Affected by the Tissue-Harvesting Procedure. *Cytotherapy* 2006, 8, 166-177.
- Paunescu, V.; Deak, E.; Herman, D.; Siska, I. R.; Tanasie, G.; Bunu, C.; Anghel, S.; Tatu, C. A.; Oprea, T. I.; Henschler, R.; Ruster, B.; Bistran, R.; Seifried, E. In Vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells to Epithelial Lineage. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2007, 11, 502-508.
- Perantoni, A. O. Renal Development: Perspectives on a Wnt-Dependent Process. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2003, 14, 201-208.
- Pfaffl, M. W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, e45.
- Philp, D.; Chen, S. S.; Fitzgerald, W.; Orenstein, J.; Margolis, L.; Kleinman, H. K. Complex Extracellular Matrices Promote Tissue-Specific Stem Cell Differentiation. *Stem Cells* 2005, 23, 288-296.
- Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 1999, 284, 143-147.
- Planat-Benard, V.; Silvestre, J. S.; Cousin, B.; Andre, M.; Nibbelink, M.; Tamarat, R.; Clergue, M.; Manneville, C.; Saillan-Barreau, C.; Duriez, M.; Tedgui, A.; Levy, B.; Penicaud, L.; Casteilla, L. Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells - Physiological and Therapeutic Perspectives. *Circulation* 2004, 109, 656-663.
- Poulosom, R.; Forbes, S. J.; Hodivala-Dilke, K.; Ryan, E.; Wyles, S.; Navaratnarasah, S.; Jeffery, R.; Hunt, T.; Alison, M.; Cook, T.; Pusey, C.; Wright, N. A. Bone Marrow

- Contributes to Renal Parenchymal Turnover and Regeneration. *J. Pathol.* 2001, 195, 229-235.
- Prockop, D. J. "Stemness" Does Not Explain the Repair of Many Tissues by Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal (MSCs). *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2007, 82, 241-243.
 - Qian, H.; Yang, H.; Xu, W.; Yan, Y.; Chen, Q.; Zhu, W.; Cao, H.; Yin, Q.; Zhou, H.; Mao, F.; Chen, Y. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Rat Acute Renal Failure by Differentiation into Renal Tubular Epithelial-Like Cells. *Int. J. Mol. Med.* 2008, 22, 325-332.
 - Qiao, J.; Sakurai, H.; Nigam, S. K. Branching Morphogenesis Independent of Mesenchymal-Epithelial Contact in the Developing Kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1999, 96, 7330-7335.
 - Ricardo, S. D.; Deane, J. A. Adult Stem Cells in Renal Injury and Repair. *Nephrology (Carlton.)* 2005, 10, 276-282.
 - Rider, D. A.; Nalathamby, T.; Nurcombe, V.; Cool, S. M. Selection Using the Alpha-1 Integrin (CD49a) Enhances the Multipotentiality of the Mesenchymal Stem Cell Population From Heterogeneous Bone Marrow Stromal Cells. *J. Mol. Histol.* 2007.
 - Rigotti, G.; Marchi, A.; Galie, M.; Baroni, G.; Benati, D.; Krampera, M.; Pasini, A.; Sbarbati, A. Clinical Treatment of Radiotherapy Tissue Damage by Lipoaspirate Transplant: a Healing Process Mediated by Adipose-Derived Adult Stem Cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007, 119, 1409-1422.
 - Rodriguez, L. V.; Alfonso, Z.; Zhang, R.; Leung, J.; Wu, B.; Ignarro, L. J. Clonogenic Multipotent Stem Cells in Human Adipose Tissue Differentiate into Functional Smooth Muscle Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2006, 103, 12167-12172.
 - Sabatini, F.; Petecchia, L.; Taviani, M.; Jodon, d. V., V; Rossi, G. A.; Brouty-Boye, D. Human Bronchial Fibroblasts Exhibit a Mesenchymal Stem Cell Phenotype and Multilineage Differentiating Potentialities. *Lab Invest* 2005, 85, 962-971.
 - Safford, K. M.; Hicok, K. C.; Safford, S. D.; Halvorsen, Y. D.; Wilkison, W. O.; Gimble, J. M.; Rice, H. E. Neurogenic Differentiation of Murine and Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 294, 371-379.
 - Safford, K. M.; Safford, S. D.; Gimble, J. M.; Shetty, A. K.; Rice, H. E. Characterization of Neuronal/Glial Differentiation of Murine Adipose-Derived Adult Stromal Cells. *Exp. Neurol.* 2004, 187, 319-328.

- Salvolini, E.; Lucarini, G.; Zizzi, A.; Orciani, M.; Di Benedetto, G.; Di Primio, R. Human Skin-Derived Mesenchymal Stem Cells As a Source of VEGF and Nitric Oxide. *Arch. Dermatol. Res.* 2009.
- Sasaki, M.; Abe, R.; Inokuma, D.; Ando, S.; Shimizu, H. Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Multiple Skin Cell Types and Contribute to Wound Repair. *Journal of Investigative Dermatology* 2006, 126, 9.
- Saxen, L.; Sariola, H. Early Organogenesis of the Kidney. *Pediatric Nephrology* 1987, 1, 385-392.
- Schuldiner, M.; Yanuka, O.; Itskovitz-Eldor, J.; Melton, D. A.; Benvenisty, N. Effects of Eight Growth Factors on the Differentiation of Cells Derived From Human Embryonic Stem Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97, 11307-11312.
- Schumacher, K. M.; Phua, S. C.; Schumacher, A.; Ying, J. Y. Controlled Formation of Biological Tubule Systems in Extracellular Matrix Gels in Vitro. *Kidney Int.* 2008.
- Self, M.; Lagutin, O. V.; Bowling, B.; Hendrix, J.; Cai, Y.; Dressler, G. R.; Oliver, G. Six2 Is Required for Suppression of Nephrogenesis and Progenitor Renewal in the Developing Kidney. *EMBO J.* 2006, 25, 5214-5228.
- Sengenès, C.; Lolmede, K.; Zakaroff-Girard, A.; Busse, R.; Bouloumie, A. Preadipocytes in the Human Subcutaneous Adipose Tissue Display Distinct Features From the Adult Mesenchymal and Hematopoietic Stem Cells. *J. Cell Physiol* 2005, 205, 114-122.
- Shimony, N.; Avrahami, I.; Gorodetsky, R.; Elkin, G.; Tzukert, K.; Zangi, L.; Levdansky, L.; Krasny, L.; Haviv, Y. S. A 3D Rotary Renal and Mesenchymal Stem Cell Culture Model Unveils Cell Death Mechanisms Induced by Matrix Deficiency and Low Shear Stress. *Nephrol. Dial. Transplant* 2008.
- Shu, C.; Li, T. Y.; Tsang, L. L.; Fok, K. L.; Lo, P. S.; Zhu, J. X.; Ho, L. S.; Chung, Y. W.; Chan, H. C. Differentiation of Adult Rat Bone Marrow Stem Cells into Epithelial Progenitor Cells in Culture. *Cell Biol. Int.* 2006, 30, 823-828.
- Sotiropoulou, P. A.; Perez, S. A.; Salagianni, M.; Baxevanis, C. N.; Papamichail, M. Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2006, 24, 462-471.
- Suga, H.; Matsumoto, D.; Eto, H.; Inoue, K.; Aoi, N.; Kato, H.; Araki, J.; Yoshimura, K. Functional Implications of CD34 Expression in Human Adipose-Derived Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Dev.* 2009.

- Taub, M.; Wang, Y.; Szczesny, T. M.; Kleinman, H. K. Epidermal Growth Factor or Transforming Growth Factor Alpha Is Required for Kidney Tubulogenesis in Matrigel Cultures in Serum-Free Medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 1990, 87, 4002-4006.
- Terada, Y.; Tanaka, H.; Okado, T.; Shimamura, H.; Inoshita, S.; Kuwahara, M.; Sasaki, S. Expression and Function of the Developmental Gene Wnt-4 During Experimental Acute Renal Failure in Rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14, 1223-1233.
- Timper, K.; Seboek, D.; Eberhardt, M.; Linscheid, P.; Christ-Crain, M.; Keller, U.; Muller, B.; Zulewski, H. Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Insulin, Somatostatin, and Glucagon Expressing Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 341, 1135-1140.
- Togel, F.; Hu, Z. M.; Weiss, K.; Isaac, J.; Lange, C.; Westenfelder, C. Administered Mesenchymal Stem Cells Protect Against Ischemic Acute Renal Failure Through Differentiation-Independent Mechanisms. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2005, 289, F31-F42.
- Togel, F.; Weiss, K.; Yang, Y.; Hu, Z.; Zhang, P.; Westenfelder, C. Vasculotropic, Paracrine Actions of Infused Mesenchymal Stem Cells Are Important to the Recovery From Acute Kidney Injury. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 2007, 292, F1626-F1635.
- Van, H., V; Skurk, T.; Rohrig, K.; Lee, Y. M.; Halbleib, M.; Aprath-Husmann, I.; Hauner, H. Effect of BMI and Age on Adipose Tissue Cellularity and Differentiation Capacity in Women. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 2003, 27, 889-895.
- Van, H., V; Rohrig, K.; Hauner, H. Comparison of Proliferation and Differentiation Capacity of Human Adipocyte Precursor Cells From the Omental and Subcutaneous Adipose Tissue Depot of Obese Subjects. *Metabolism* 2004, 53, 632-637.
- Van, H., V; Skurk, T.; Hauner, H. Primary Culture and Differentiation of Human Adipocyte Precursor Cells. *Methods Mol. Med.* 2005, 107, 125-135.
- Varma, M. J.; Breuls, R. G.; Schouten, T. E.; Jurgens, W. J.; Bontkes, H. J.; Schuurhuis, G. J.; van Ham, S. M.; van Milligen, F. J. Phenotypical and Functional Characterization of Freshly Isolated Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2007, 16, 91-104.
- Vats, A.; Bielby, R. C.; Tolley, N.; Dickinson, S. C.; Boccaccini, A. R.; Hollander, A. P.; Bishop, A. E.; Polak, J. M. Chondrogenic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells: the Effect of the Micro-Environment. *Tissue Eng* 2006, 12, 1687-1697.

- Villanueva, S.; Cespedes, C.; Vio, C. P. Ischemic Acute Renal Failure Induces the Expression of a Wide Range of Nephrogenic Proteins. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 2006, 290, R861-R870.
- von Heimbürg, D.; Hemmrich, K.; Haydarlioglu, S.; Staiger, H.; Pallua, N. Comparison of Viable Cell Yield From Excised Versus Aspirated Adipose Tissue. *Cells Tissues. Organs* 2004, 178, 87-92.
- Wagner, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J.; Schwager, C.; Eckstein, V.; Ansorge, W.; Ho, A. D. Comparative Characteristics of Mesenchymal Stem Cells From Human Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood. *Experimental Hematology* 2005, 33, 1402-1416.
- Wagner, W.; Ho, A. D. Mesenchymal Stem Cell Preparations - Comparing Apples and Oranges. *Stem Cell Reviews* 2007, 3, 239-248.
- Wallner, E. I.; Yang, Q. W.; Peterson, D. R.; Wada, J.; Kanwar, Y. S. Relevance of Extracellular Matrix, Its Receptors, and Cell Adhesion Molecules in Mammalian Nephrogenesis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 1998, 44, F467-F477.
- Wang, T.; Xu, Z.; Jiang, W.; Ma, A. Cell-to-Cell Contact Induces Mesenchymal Stem Cell to Differentiate into Cardiomyocyte and Smooth Muscle Cell. *Int. J. Cardiol.* 2006, 109, 74-81.
- Watt, F. M.; Hogan, B. L. M. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. *Science* 2000, 287, 1427-1430.
- Wieser, M.; Stadler, G.; Jennings, P.; Streubel, B.; Pfaller, W.; Ambros, P.; Riedl, C.; Katinger, H.; Grillari, J.; Grillari-Voglauer, R. HTERT Alone Immortalizes Epithelial Cells of Renal Proximal Tubules Without Changing Their Functional Characteristics. *Ocean Science* 2008, 4, F1365-F1375.
- Wolbank, S.; Stadler, G.; Peterbauer, A.; Gillich, A.; Karbiener, M.; Streubel, B.; Wieser, M.; Katinger, H.; van Griensven, M.; Redl, H.; Gabriel, C.; Grillari, J.; Grillari-Voglauer, R. Telomerase Immortalized Human Amnion- and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Maintenance of Differentiation and Immunomodulatory Characteristics. *Tissue Eng Part A* 2009, 15, 1843-1854.
- Wong, C. Y.; Cheong, S. K.; Mok, P. L.; Leong, C. F. Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Mesangial Cells in Post-Glomerular Injury Murine Model. *Pathology* 2008, 40, 52-57.

- Wu, D. C.; Boyd, A. S.; Wood, K. J. Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives Have a Fragile Immune Privilege but Still Represent Novel Targets of Immune Attack. *Stem Cells* 2008, 26, 1939-1950.
- Wu, Y.; Chen, L.; Scott, P. G.; Tredget, E. E. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *Stem Cells* 2007, 25, 2648-2659.
- Xu, C.; Inokuma, M. S.; Denham, J.; Golds, K.; Kundu, P.; Gold, J. D.; Carpenter, M. K. Feeder-Free Growth of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 971-974.
- Yoshimura, K.; Shigeura, T.; Matsumoto, D.; Sato, T.; Takaki, Y.; Aiba-Kojima, E.; Sato, K.; Inoue, K.; Nagase, T.; Koshima, I.; Gonda, K. Characterization of Freshly Isolated and Cultured Cells Derived From the Fatty and Fluid Portions of Liposuction Aspirates. *J. Cell Physiol* 2006, 208, 64-76.
- Yoshimura, K.; Sato, K.; Aoi, N.; Kurita, M.; Inoue, K.; Suga, H.; Eto, H.; Kato, H.; Hirohi, T.; Harii, K. Cell-Assisted Lipotransfer for Facial Lipoatrophy: Efficacy of Clinical Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Dermatol. Surg.* 2008, 34, 1178-1185.
- Zhu, W.; Xu, W.; Jiang, R.; Qian, H.; Chen, M.; Hu, J.; Cao, W.; Han, C.; Chen, Y. Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow Favor Tumor Cell Growth in Vivo. *Exp. Mol. Pathol.* 2006, 80, 267-274.
- Zile, M. H. Vitamin A and Embryonic Development: an Overview. *J. Nutr.* 1998, 128, 455S-458S.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P.; Hedrick, M. H. Multilineage Cells From Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering* 2001, 7, 211-228.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D. A.; Huang, J. I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z. C.; Fraser, J. K.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* 2002, 13, 4279-4295.

Buch:

- Biologie, Neil A. Campbell
Teil VII: Form und Funktion der Tiere
Kapitel 36, S.856
1997 Spektrum Akademischer Verlag,
Heidelberg; Berlin; Oxford
2. korrigierter Nachdruck

Anhang 1: Nukleofektion mit hTERT

Replikative Seneszenz ist die Folge von wiederholten Zellteilung, die bei normalen humanen Zellen die Zahl der Verdoppelungen abhängig von der Telomerase begrenzt. Durch eine Überexpression von hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase) kann die Lebensspanne einer Zelle verlängert werden. Außerdem kann Wachstum verbessert werden und der Karyotyp stabilisiert werden. ASC wurden durch eine ektopische Expression von hTERT bereits immortalisiert. Die Zelllinie war bezüglich der Morphologie, der Expression von Oberflächenmarkern und dem Karyotyp größtenteils unverändert. Das Differenzierungspotential wurde als gleich oder besser beschrieben [Wolbank et al., 2009]. Die Immortalisierung über hTERT wurde darüber hinaus auch in renalen epithelialen Tubuluszellen proximalen Ursprungs gezeigt. Die Zellen wiesen eine unveränderte Morphologie sowie die gleichen funktionellen Eigenschaften wie die Bildung von TJ Proteinen nach [Wieser et al., 2008]. Durch hTERT immortalisierte MSC könnten aber auch ein Risiko zur Tumorbildung beinhalten [Burns et al., 2005].

Methode: Transfektion

Transformation

- SOC-Medium (100ml: 2g Trypton, 0,5g Hefeextrakt, 200µl NaCl- Lösung (5M), 830µl KCl- Lösung (3M), 1ml HgSO₄- Lösung (1M), in dH₂O; autoklavieren; danach hinzufügen: 500µl MgCl₂- Lösung (2M), 20mM Glucose) pH 7
- LB-Medium (1L: 10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl in dH₂O autoklavieren; danach hinzufügen: 500µl Ampicillin (50mg/ml)) pH 7
- TOPO TA Cloning Kit
- Verdau: 10µl DNA, 2µl EcoR1, 4µl 4x Puffer 3, 24µl dH₂O
- S1 (50mM Tris/HCl 3,03g/500ml, 10mM EDTA, 100µg RnaseA /ml) pH 8
- S2 (200mM NaOH 8g/l, 1% SDS)
- S3 (2,8M Kaliumacetat) pH 5,1
- pLXSN Vektor mit hTERT oder ohne „empty“ als Kontrolle
- Nukleofektions Kit für Primary mammary epithelial cells
- MS-Medium (Transferrin (5 µg/ml), Hydrocortison (500ng/ml), Adrenalin (500ng/ml), hEGF (10ng/ml))

2µl der TOPO TA Cloning Reaktion wurden zu den kompetenten Bakterien *e.coli* DH2α gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30sec bei 42°C. Die Probe wurde in 250µl SOC-Medium aufgenommen und für 1h bei RT geschüttelt, bevor 10-50µl der Proben auf die Platten mit Ampicillinresistenz ausplattiert wurden. Am nächsten Tag konnten die Klone gepickt werden. Pro Ansatz reichten 100ng Plasmid.

Mini-Prep

Für die Mini-Prep wurden einzelne Kolonien in LB-Medium über Nacht kultiviert. Ein Aliquot wurde 1:1 mit Glycerin versetzt und eingefroren. Die restliche Bakteriensuspension

wurde bei 3000Upm für 5min zentrifugiert und das Pellet in 300µl S1 Puffer gelöst. Die gleiche Menge an S2 Puffer wurde hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Ebenso wurde mit dem S3 Puffer verfahren. Die homogene Lösung wurde für 15min bei 13000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und mit 0,7Vol Isopropanol für 1h gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 15min bei 13000Upm bei 4°C wurde das Pellet zuerst in 70%igem und anschließend in absoluten Ethanol

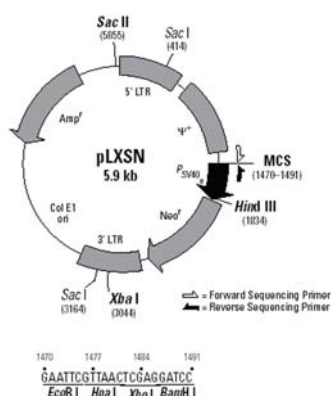


Abb. 67 Lentiviraler Vektor *pLXSN*:
 Restriktionsmappe und Multiple Cloning Site

gewaschen, bevor es bei 37°C getrocknet wurde. Das trockene Pellet wurde zum Schluss in 100µl dH₂O aufgenommen.

Ein Verdau mit Enzymen diente zur Überprüfung der Transformation. hTERT wurde mit EcoR1 an beiden Seiten in den Vektor gebracht. Für das Gel wurde ein Verdau von 40µl Gesamtvolumen angesetzt. Der Verdau erfolgte mit einem Gemisch aus DNA, EcoR1, 4xPuffer 3 und dH₂O bei 37°C über Nacht.

Plasmidaufreinigung mit Säule

Für die Plasmidaufreinigung mit Säule wurde das Bakterienpellet in S1 Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von S2 Puffer folgte eine 5-minütige Inkubation bei RT. Die Inkubation mit S3 Puffer wurde auf Eis durchgeführt. Anschließend wurde die Probe bei hoher Geschwindigkeit und 4°C für 5 min zentrifugiert. Eine Nucleonbond AX Säule wurde mit

N2Puffer äquilibriert, bevor sie mir der Probe beladen wurde. Die Säule wurde danach mit N3 Puffer gewaschen und mit N8 Puffer wurde die Plasmid DNA eluiert. Die Präzipitation des gereinigten Plasmids erfolgte mit 0,7Vol Isopropanol. Vor der Aufnahme des Plasmids in dH₂O wurde das Pellet mit 70%igem und absolutem Ethanol gewaschen.

Nukleofektion

Die Transfektion durch die Nukleofektortechnologie ist eine nicht-virale Methode basierend auf der Elektroporation, die bei Zelllinien und primäre Zellen angewendet werden kann. Die elektrischen Einstellungen waren vorprogrammiert und nicht einsehbar. Ein Nukleofektionskit enthält eine Nukleofektionslösung und Zusätze, die nicht näher aufgeführt, aber für die jeweiligen Zellen optimiert sind. Die DNA wird direkt in den Nukleus gebracht. Um ein optimales Ergebnis zu erhalten, wurde eine Plasmid Konzentration von 1-5µg pro Nukleofektionsansatz (100µl) gewählt. Eine höhere Konzentration könnte zu einer besseren Transfektionsrate führen, würde aber auch gleichzeitig die Mortalität der Zellen erhöhen. Die Zelldichte der adherenten Zellen zur Nukleofektion sollte zwischen 2×10^5 und 2×10^6 pro Probe liegen. Als Vektor wurde der retrovirale Vektor pLXSN verwendet, in den hTERT integriert war. Es wurden Tubuluszellen (proximal, distal, Negativfraktion) für die Nukleofektion verwendet, die in MS Medium kultiviert wurden. Die Zellen wurden abtrypsinisiert und für 10min bei 100xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100µl der Basic Nucleofector Solution aufgenommen. Der Lösung wurde die Plasmid DNA zugesetzt und in eine Kuvette (amaxa) überführt. Die geschlossene Kuvette wurde in den Nukleofektor eingesetzt und das Programm wurde gestartet. Für die Verwendung des Primary Mammary Epithelial Cell Kits waren die Programme S-05, T-13, T-20, T-23 oder U-17 empfohlen und wurden auch alle getestet. Vorgewärmtes Medium wurde zu der Lösung gegeben und die Zellen wurden in 6-Loch Platten ausgesät. Die Selektion der nach der Nukleofektion transfizierten Zellen erfolgte über G418, für das die einzusetzende Konzentration von 600µg/ml über einen Titrationsversuch ermittelt worden war und für das der verwendete Vektor eine Resistenz trug.

Ergebnisse

Die Nukleofektion wurde zweimal durchgeführt. Bei dem ersten Versuch überlebten die Zellen die Nukleofektion, nicht aber die anschließende Selektion mit G418, woraus

geschlossen wurde, dass das Plasmid nicht in den Zellen integriert worden war und somit keine resistenten Zellen entstanden waren. Die verwendete Konzentration von G418 lag mit 600µg/ml höher als die in der Literatur verwendete [Wieser et. Al., 2008], war aber als zytotoxische Konzentration auf den verwendeten Zellen vorher ermittelt worden. Bei dem zweiten Versuch starben die Zellen bereits nach der Nukleofektion. Auch ein poolen der mit verschiedenen Programmen im Nukleofektor transfizierten Zellen um die Zelldichte zu erhöhen, konnte die Zellen nicht retten. Die nicht transfizierten Kontrollzellen waren in gutem Zustand. Es ist wahrscheinlich, dass die Tubuluszellen die Nukleofektion nicht vertragen haben. Die Proben der Mini-Prep wurden zur Kontrolle, ob der Vektor richtig vervielfältigt wurde mit dem Restriktionsenzym Eco R1 geschnitten, auf ein Gel aufgetragen und laufen gelassen. Wie die Abbildung 67 zeigt, konnte sowohl der Vektor an sich (empty) als auch das hinein klonierte hTERT Fragment nachgewiesen werden.

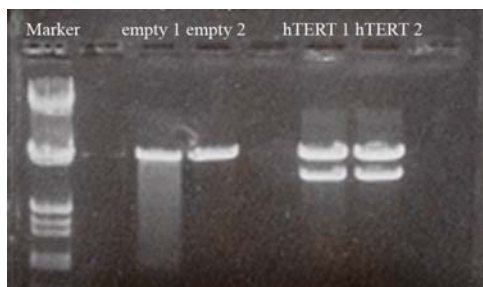


Abb. 68 Vektorkontrolle hTERT; der Vektor wurde zur Kontrolle mit Eco R1 geschnitten. Ein Fragment in der Größe des hTERT konnte nachgewiesen werden.

Anhang 2 - Tabellen

Tab. 13 Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren; Angabe in Fluoreszenzeinheiten (n=3)

	Mittelwerte \pm SD 1d	Mittelwert \pm SD 3d	Mittelwert \pm SD 6d
DF	17859,70 \pm 4564,94	19910,40 \pm 4659,22	26836,77 \pm 6451,83
ATRA	16335,69 \pm 6312,97	17945,44 \pm 5084,32	23379,25 \pm 4549,81
DM	12882,46 \pm 6022,69	10322,90 \pm 3027,55	11458,70 \pm 1561,01
WT	17981,58 \pm 6904,19	22166,03 \pm 5636,53	33413,59 \pm 10842,52
aFGF/VEGF	17796,56 \pm 7427,52	20570,65 \pm 5455,76	29197,67 \pm 7523,67
bFGF	18588,88 \pm 8223,93	23158,78 \pm 7145,90	36561,63 \pm 10449,48
VEGF	18046,49 \pm 7696,54	20003,68 \pm 4403,63	28676,00 \pm 8644,50
bFGF/VEGF	19152,52 \pm 8227,11	30061,80 \pm 9803,64	34520,79 \pm 9505,45
DF 2% FKS	16303,15 \pm 7258,56	18384,20 \pm 3090,01	17080,28 \pm 4519,88

Tab. 14 Proliferationsassay 2; Angabe in Fluoreszenzeinheiten (n=3)

	Mittelwert \pm SD 1d	Mittelwert \pm SD 3d	Mittelwert \pm SD 6d
DF	16780,58 \pm 5131,03	22017,86 \pm 5094,64	28708,47 \pm 5100,74
ATRA	17199,00 \pm 5709,90	20877,17 \pm 5597,18	24806,56 \pm 2784,90
DM	13683,58 \pm 5828,11	11863,67 \pm 5624,64	11459,39 \pm 1561,89
WT	18003,22 \pm 6895,11	26137,75 \pm 4771,69	38467,22 \pm 5970,18
bFGF	19092,19 \pm 7818,26	27984,08 \pm 8148,34	41841,47 \pm 5981,39
bFGF/VEGF	19643,58 \pm 7898,69	34282,36 \pm 5323,89	38434,72 \pm 6368,19
DF 2% FKS	17490,92 \pm 6407,03	20543,25 \pm 3508,38	20599,50 \pm 5827,39

Tab. 15 Proliferationsassay bFGF; Angabe in Fluoreszenzeinheiten (n=4)

	Mittelwert \pm SD 1d	Mittelwert \pm SD 3d	Mittelwert \pm SD 6d
DM	18938,71 \pm 15871,66	22978,51 \pm 13525,60	20314,92 \pm 4838,30
DF 2%	19384,96 \pm 15302,90	22134,73 \pm 9200,64	24989,89 \pm 4909,49
DF 2% + bFGF (100)	20821,27 \pm 17124,95	25860,16 \pm 10080,71	33387,67 \pm 6012,20
DF 2% + bFGF (10)	20891,29 \pm 15649,18	23426,73 \pm 7392,21	29404,83 \pm 4511,20
DF 2% + bFGF (2)	19642,18 \pm 14120,46	24077,44 \pm 8502,29	25432,86 \pm 4227,28
DF	19290,04 \pm 16289,67	26671,41 \pm 9713,05	32950,00 \pm 11077,70
DF + bFGF (100)	20629,96 \pm 14983,77	32206,05 \pm 9036,85	39943,97 \pm 14233,72
DF + bFGF (10)	19149,82 \pm 13531,21	31700,09 \pm 8391,26	38881,00 \pm 8981,70
DF + bFGF (2)	20129,43 \pm 14293,88	28867,06 \pm 6069,51	33646,08 \pm 10414,47
DF + bFGF/VEGF (100)	19305,79 \pm 12138,83	31597,56 \pm 4422,75	41046,42 \pm 14309,78
DF + bFGF/VEGF (10)	18335,99 \pm 12685,05	31035,19 \pm 5495,36	36656,14 \pm 12452,73
DF + aFGF/VEGF	18438,43 \pm 13088,83	25043,49 \pm 8067,30	32349,97 \pm 11555,14
DF + VEGF	20902,04 \pm 16282,94	26605,91 \pm 5577,97	35537,25 \pm 12951,43
DF + ATRA	17779,46 \pm 12434,25	20884,29 \pm 9346,26	28669,67 \pm 7654,21
WT-Mix + DF	19668,63 \pm 13686,18	29348,44 \pm 5426,29	35895,00 \pm 10530,32

Tab. 16 Proliferationsassay ATRA, ActA und BMP-7; Angabe in Fluoreszenzeinheiten (n=5)

	Mittelwert \pm SD 1d	Mittelwert \pm SD 3d	Mittelwert \pm SD 6d
DF10%	28777,33 \pm 3674,59	32433,25 \pm 4915,83	36513,63 \pm 5128,80
DF 2%	26830,29 \pm 4294,57	27897,65 \pm 5759,37	30282,83 \pm 7636,27
DF 2% + ATRA	25296,96 \pm 4080,52	27118,19 \pm 5961,96	28406,94 \pm 8069,24
DF 2% + EGF	27438,44 \pm 3270,16	30851,31 \pm 5341,54	34398,92 \pm 6387,35
DF 2% + BMP-7	25589,13 \pm 3950,68	27454,63 \pm 5004,63	29746,79 \pm 5036,51
DF 2% + Activin A	25259,71 \pm 942,36	29117,27 \pm 4768,36	29286,77 \pm 5685,62
DF 2% + ATRA + BMP-7 + Act-A	23543,92 \pm 3147,40	27466,63 \pm 6377,49	28958,63 \pm 6043,99
DF 2% + ATRA + BMP-7 + Act-A hoch	25024,98 \pm 2020,18	27785,77 \pm 5437,08	27828,94 \pm 4550,76
DF 2% + ATRA + BMP-7 + Act-A niedrig	25106,88 \pm 2916,96	28091,81 \pm 5683,99	29669,36 \pm 5458,64

Tab. 17 Western Blot Ergebnisse mit den Medienzusätzen ATRA, ActA und BMP-7 (n=7 für CK18; n=3 für ZO-1)

	Mittelwert \pm SD CK18	Mittelwert \pm SD ZO-1
DF2%	0,36 \pm 0,29	0,21 \pm 0,24
DF10%	0,45 \pm 0,31	0,66 \pm 0,43
DF2% + ATRA	1,29 \pm 1,64	0,46 \pm 0,17
DF2% + BMP-7	0,37 \pm 0,26	0,32 \pm 0,09
DF2% + ActA	1,17 \pm 2,30	0,30 \pm 0,06
DF2%+ ATRA+ActA+BMP-7	0,99 \pm 0,77	0,20 \pm 0,20
DF2%+ ATRA+ActA+BMP7 hohe Konzentration	1,23 \pm 1,05	0,11 \pm 0,05
DF2%+ ATRA+ActA+BMP7 niedrigere Konzentration	2,27 \pm 3,24	0,86 \pm 0,87

Tab. 18 Western Blot Ergebnisse mit den Medienzusätzen ATRA, ActA und BMP-7 bei konfluenten Zellen (n=8 für CK18; n=6 für ZO-1)

	Mittelwert \pm SD CK18	Mittelwert \pm SD ZO-1
DF2%	0,59 \pm 0,31	0,56 \pm 0,23
DF10%	0,65 \pm 0,41	1,03 \pm 1,13
DF2% + ATRA	0,71 \pm 0,36	1,25 \pm 1,87
DF2% + BMP-7	0,66 \pm 0,48	0,59 \pm 0,44
DF2% + ActA	0,74 \pm 0,49	0,76 \pm 0,55
DF2%+ ATRA+ActA+BMP7	4,56 \pm 10,38	4,25 \pm 8,02
DF2%+ ATRA+ActA+BMP7 hohe Konzentration	2,43 \pm 3,92	1,60 \pm 2,10
DF2%+ ATRA+ActA+BMP7 niedrigere Konzentration	2,87 \pm 3,90	3,50 \pm 4,78
DF2% + EGF	1,19 \pm 0,85	0,52 \pm 0,20
DF2% + EGF + ATRA	0,80 \pm 0,34	0,95 \pm 0,92
konditioniertes Medium	0,70 \pm 0,20	0,82 \pm 0,93

Tab. 19 qPCR Ergebnisse mit den Medienzusätzen ATRA, ActA und BMP-7 (n=7)

	Mittelwert SD ZO-1	± Mittelwert SD Aq1	± Mittelwert ±SD E-Cad	Mittelwert ±SD Occ	Mittelwert ±SD CK18	Mittelwert ±SD Wnt4
DF 2%	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00
DF 10%	0,95±0,31	1,34±1,83	0,78±0,64	1,13±0,84	0,66±0,52	1,29±2,58
DF 2% + ATRA	1,29±0,99	0,49±0,69	1,41±1,38	0,92±0,70	4,09±2,91	0,20±0,19
DF 2% + actA	1,18±0,42	1,55±1,62	1,11±0,40	1,04±0,61	0,81±0,42	0,77±0,45
DF 2% + BMP-7	1,41±0,94	1,20±1,13	3,39±5,81	1,55±2,23	1,96±2,59	2,12±3,90
DF 2% + ATRA + ActA + BMP7	1,17±1,35	0,26±0,19	1,04±0,84	0,86±1,13	6,37±7,94	0,55±0,62
DF 2% + ATRA + ActA + BMP7 hoch	1,04±0,99	0,27±0,25	1,61±2,01	0,65±0,65	7,62±8,67	0,49±0,46
DF 2% + ATRA + ActA + BMP7 niedrig	1,27±1,12	0,69±1,07	1,10±0,48	0,77±0,36	6,29±8,92	0,28±0,25
DF 2% + EGF	0,77±0,29	0,62±0,38	0,51±0,19	0,90±0,50	0,36±0,26	0,38±0,61
DF 2% + EGF + ATRA	1,29±0,85	0,18±0,05	0,41±0,25	0,67±0,45	1,94±2,62	0,13±0,19
konditioniertes Medium	0,90±0,99	2,47±3,83	2,12±2,46	0,93±0,58	3,22±3,42	0,20±0,30

Tab. 20 qPCR Ergebnisse mit den Medienzusätzen ATRA, ActA und BMP-7 bei konfluenten Zellen (n=6)

	Mittelwert ZO-1	±SD Mittelwert Aq1	±SD Mittelwert E-Cad	±SD Mittelwert Occ	±SD Mittelwert CK18	±SD Mittelwert Wnt4
DF 2%	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00
DF 10%	0,99±0,37	0,83±1,04	1,59±1,30	1,15±0,24	0,79±0,62	0,33±0,20
DF 2% + ATRA	0,81±0,44	0,64±0,53	1,36±1,23	0,72±0,41	2,71±1,63	0,30±0,24
DF 2% + actA	1,00±0,57	1,18±0,69	1,74±1,18	0,93±0,30	1,13±0,62	1,00±0,36
DF 2% + BMP-7	1,50±0,99	1,12±0,53	2,90±3,12	1,24±0,35	1,89±1,40	1,34±0,81
DF 2% + ATRA + actA + BMP7	0,86±0,33	0,26±0,16	1,17±0,97	1,18±0,47	4,38±2,49	0,57±0,23
DF 2% + ATRA + actA + BMP7 hoch	1,14±0,33	0,43±0,65	0,75±0,50	1,63±0,64	5,35±2,11	0,85±0,44
DF 2% FCS + ATRA + actA + BMP7 niedrig	1,18±0,91	0,41±0,44	1,51±1,23	1,23±0,91	3,41±1,64	0,56±0,25
DF 2% + EGF	1,08±0,89	0,32±0,29	0,99±0,60	1,38±0,73	0,50±0,41	0,33±0,25
DF 2% + EGF + ATRA	1,01±0,67	0,22±0,15	1,03±0,95	1,18±0,94	1,23±1,46	0,15±0,18
konditioniertes Medium	0,36±0,33	0,69±0,23	0,83±0,63	1,01±0,86	2,05±2,99	0,39±0,11

Tab. 21 Extrazelluläre Matrix aus Tubuluszellen (Western Blot, densitometrische Analyse)

	CK18/Aktin				Mittelwert \pm SD	ZO-1/Aktin				Mittelwert \pm SD
DF 10% ECM + MSC	0,46	0,23	0,00	0,12	0,20 \pm 0,20	8,42	0,85			4,64 \pm 5,35
DF 10% ECM + MSC + ATRA	0,44	1,44	0,16	2,30	1,08 \pm 0,98	11,65	0,88			6,27 \pm 7,62
DF 10% ECM + MSC + bFGF	0,53	0,23	0,00	0,06	0,20 \pm 0,24	2,59	1,05			1,82 \pm 1,09
DF 10% ECM + MSC + bFGF+ VEGF	0,91	0,03	0,00	0,15	0,27 \pm 0,43	3,49	2,80			3,15 \pm 0,49
DF 10% ECM + MSC + Wt-Mix	0,00	0,09	0,00	0,27	0,09 \pm 0,13	0,51	0,00			0,25 \pm 0,36
DF 10% MSC		0,65	0,00	2,36	1,00 \pm 1,22	1,26	3,03			2,14 \pm 1,26
DF 10% MSC + ATRA		3,08	0,19		1,63 \pm 2,05	1,62	2,15			1,89 \pm 0,38
DF 10% MSC + bFGF		0,19	0,00		0,09 \pm 0,13	3,52	0,17			1,84 \pm 2,37
DF 10% MSC + bFGF+ VEGF		0,02	0,00		0,01 \pm 0,01	2,74	0,22			1,48 \pm 1,78
DF 10% + Wt-Mix		0,40	0,00		0,20 \pm 0,28	3,14	0,64			1,89 \pm 1,77

Tab. 22 pPCR extrazelluläre Matrix aus Tubuluszellen

	CK18 Mittelwert \pm SD (n=4 ECM, n=3 MSC)	wnt4 Mittelwert \pm SD (n=4 ECM, n=3 MSC)	smA Mittelwert (n=2)	Aqp1 Mittelwert (n=2) ECM, n=1 MSC)
Kontrolle DF 10%	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00	1,00
DF 10% + ATRA	1,71 \pm 1,56	0,65 \pm 0,38	2,54	
DF 10% + bFGF	0,33 \pm 0,52	1,89 \pm 3,21	0,71	0,59
DF 10% + bFGF + VEGF	0,30 \pm 0,42	0,31 \pm 0,41	0,46	0,04
DF 10% + WT-Mix	0,09 \pm 0,11	0,49 \pm 0,69	0,63	0,45
ECM + DF 10%	0,07 \pm 0,04	0,19 \pm 0,22	5,06	1,27
ECM + DF 10% + ATRA	0,39 \pm 0,26	0,42 \pm 0,21	0,99	0,01
ECM + DF 10% + bFGF	0,05 \pm 0,06	0,12 \pm 0,13	0,61	0,18
ECM + DF 10% + bFGF + VEGF	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	1,08	0,02
ECM + WT-Mix	0,02 \pm 0,01	0,04 \pm 0,03	0,52	0,07

Tab. 23 CK18 und ZO-1 Expression bei Matrigel als dicke Beschichtung (Western Blot, densitometrische Analyse)

Matrigel 3D	CK18/Aktin				Mittelwert \pm SD	ZO-1/Aktin				Mittelwert \pm SD
Kontrolle DF2%	1,02	0,53	0,42	1,50	0,87 \pm 0,50	0,00	1,72	0,44	0,18	0,59 \pm 0,78
Kontrolle konditioniertes Medium	1,57	0,92	0,54	1,09	1,03 \pm 0,43	1,22	0,88	1,21	0,14	0,86 \pm 0,50
Col IV DF2%	0,81	1,61	0,69	0,99	1,03 \pm 0,41	0,14	1,28	0,64	0,16	0,55 \pm 0,54
Col IV konditioniertes Medium	1,04	2,38	0,38	0,95	1,19 \pm 0,85	0,23	0,64	0,89	0,02	0,44 \pm 0,39
Matrigel DF2%	4,43	2,68	1,04	0,00	2,04 \pm 1,94	0,00	0,45	0,52	0,35	0,33 \pm 0,23
Matrigel konditioniertes Medium	14,28	9,02	0,89	0,00	6,04 \pm 6,82	0,00	0,20	0,00	0,00	0,05 \pm 0,10

Tab. 24 CK18 und ZO- 1 Expression bei Matrigel als Medienzusatz (Western Blot, densitometrische Analyse)

Matrigel als Medienzusatz	ZO-1/Aktin						Mittelwert \pm SD	CK18/Aktin		Mittelwert \pm SD
Kontrolle DF2%	0,53	0,02	5,76	0,63	1,90	1,37	1,70 \pm 2,10	0,51	0,36	0,43 \pm 0,10
Kontrolle konditioniertes Medium	0,90	0,56	6,70	0,47	0,63	0,59	1,64 \pm 2,48	0,62	0,33	0,47 \pm 0,20
Col IV DF2%	0,31			0,78	2,55	0,06	0,92 \pm 1,13	0,14	0,00	0,07 \pm 0,10
Col IV konditioniertes Medium	0,35			1,81		0,75	0,97 \pm 0,75	0,36	0,69	0,52 \pm 0,23
Matrigel DF2%	0,95	1,45	1,87	5,42	0,58	1,79	2,01 \pm 1,74	0,65	0,86	0,76 \pm 0,15
Matrigel konditioniertes Medium	1,14	20,45	0,91	7,58	0,06	1,52	5,28 \pm 7,91	0,83	1,37	1,10 \pm 0,38

Tab. 25 CK18 Expression bei Matrigel als dünne Beschichtung (Western Blot, densitometrische Analyse)

Matrigel als Beschichtung	CK18/Aktin				Mittelwert \pm SD
50 μ g/ml Matrigel DF2%		0,00		0,03	0,02 \pm 0,02
100 μ g/ml Matrigel DF2%		0,00	1,16	0,03	0,40 \pm 0,66
200 μ g/ml Matrigel DF2%		0,00	0,69	0,07	0,25 \pm 0,38
500 μ g/ml Matrigel DF2%		0,00	0,73	0,16	0,30 \pm 0,38
Collagen IV DF2%		0,00	0,85	0,11	0,32 \pm 0,46
Kontrolle DF 2%		0,00	0,42	0,11	0,17 \pm 0,22
50 μ g/ml Matrigel ATRA		0,00	0,52	0,52	0,35 \pm 0,30
100 μ g/ml Matrigel ATRA		0,00	0,43	0,61	0,35 \pm 0,31
200 μ g/ml Matrigel ATRA		0,00	0,60	1,61	0,74 \pm 0,81
500 μ g/ml Matrigel ATRA		0,53	0,67	1,17	0,79 \pm 0,33
Collagen IV ATRA		0,81	1,12	0,50	0,81 \pm 0,31
Kontrolle ATRA		0,91	0,97	0,11	0,66 \pm 0,48
50 μ g/ml Matrigel kond. Medium	0,41	0,88	0,80	0,03	0,53 \pm 0,39
100 μ g/ml Matrigel kond. Medium	0,46	0,87	0,94	0,08	0,59 \pm 0,40
200 μ g/ml Matrigel kond. Medium	0,75	1,11	0,56	0,20	0,66 \pm 0,38
500 μ g/ml Matrigel kond. Medium	0,00	1,10	0,74	0,38	0,55 \pm 0,47
Collagen IV kond. Medium	0,00	1,14	1,14	0,41	0,67 \pm 0,57
Kontrolle kond. Medium		1,21	0,95	0,75	0,97 \pm 0,23

Tab. 26 ZO-1 Expression bei Matrigel als dünne Beschichtung (Western Blot, densitometrische Analyse)

Matrigel als Beschichtung	ZO-1/Aktin				Mittelwert \pm SD
50µg/ml Matrigel DF2%		0,89		0,60	0,75 \pm 0,20
100µg/ml Matrigel DF2%		1,22	0,65	0,51	0,79 \pm 0,38
200µg/ml Matrigel DF2%		0,87	0,40	0,61	0,63 \pm 0,23
500µg/ml Matrigel DF2%		0,57	0,27	1,08	0,64 \pm 0,41
Collagen IV DF2%		0,36	0,51	1,10	0,65 \pm 0,39
Kontrolle DF 2%		0,25	0,36	0,81	0,47 \pm 0,29
50µg/ml Matrigel ATRA		1,05	0,00	0,80	0,62 \pm 0,55
100µg/ml Matrigel ATRA		0,88	0,00	1,35	0,74 \pm 0,68
200µg/ml Matrigel ATRA		0,86	0,00	1,21	0,69 \pm 0,62
500µg/ml Matrigel ATRA		0,55	0,00	0,70	0,42 \pm 0,37
Collagen IV ATRA		0,78	0,00	0,76	0,51 \pm 0,44
Kontrolle ATRA		0,53	0,00	0,62	0,38 \pm 0,34
50µg/ml Matrigel kond. Medium	0,38	0,39	0,40	0,53	0,43 \pm 0,07
100µg/ml Matrigel kond. Medium	0,98	0,31	0,72	1,12	0,78 \pm 0,36
200µg/ml Matrigel kond. Medium	1,58	0,34	0,42	1,40	0,93 \pm 0,64
500µg/ml Matrigel kond. Medium	5,21	0,15	0,50	1,39	1,81 \pm 2,33
Collagen IV kond. Medium	9,93	0,41	0,68	1,38	3,10 \pm 4,57
Kontrolle kond. Medium		0,26	0,43	1,65	0,78 \pm 0,76

Tab. 27 Indirekte Co-Kultur mit Membraneinsätzen mit Nierengewebe: CK 18 (Western Blot, densitometrische Analyse)

									Mittelwert \pm SD
MSC	0,32		0,91	0,40	0,93	1,03	0,12	0,86	0,65 \pm 0,89
MSC + EGF	0,26	2,74	0,95	3,28	0,58	0,80	0,34	0,59	1,19 \pm 2,53
MSC unter TEC	0,04	9,93	1,04	0,31	0,02	0,52		0,25	1,73 \pm 4,60
MSC unter TEC + EGF	0,07	15,99	0,84	0,38	0,23	0,25	0,07	0,37	2,28 \pm 4,12
MSC unter Nierengewebe	1,33	7,13	0,94	0,44	0,63	0,76	0,10	0,56	1,49 \pm 1,76
MSC unter Nierengewebe + EGF	0,26	2,94	0,79	0,57	0,46	0,56	0,94		0,93 \pm 0,91

Tab. 28 Indirekte Co-Kultur mit Membraneinsätzen mit Nierengewebe: ZO-1 (Western Blot, densitometrische Analyse)

									Mittelwert \pm SD
MSC	0,25	0,84		0,95	0,17	0,20	0,23	0,70	0,48 \pm 0,34
MSC + EGF	0,44	0,87	1,07	0,92	0,00	0,33	0,42	1,17	0,65 \pm 0,41
MSC unter TEC	0,54	1,26	1,88	0,96	1,35	0,25	0,66		0,98 \pm 0,56
MSC unter TEC + EGF	0,49	0,56	13,30	1,04	1,57	0,69	0,68	0,37	2,34 \pm 4,45
MSC unter Nierengewebe	0,38	1,20	2,53	0,67	0,90	0,33	0,32	0,54	0,86 \pm 0,74
MSC unter Nierengewebe + EGF	0,41	0,44	0,78	0,59	0,98	0,31	0,41	0,91	0,60 \pm 0,26

Tab. 29 Indirekte Co-Kultur mit Membraneinsätzen mit Tubuluszellen (Western Blot, densitometrische Analyse)

	CK18/Aktin				Mittelwert ± SD
DF 10 %	0,38	0,51	0,12	0,18	0,30±0,18
ATRA	1,49	1,20			1,34±0,21
bFGF	0,42	0,43			0,43±0,00
bFGF/VEGF	0,34	0,31			0,33±0,03
WT-Mix	0,13	0,14			0,14±0,01
DF 10 % mit Membraneinsätzen	0,27	0,07	0,02	0,26	0,15±0,13
ATRA mit Membraneinsätzen	1,05	0,12	0,22	0,80	0,55±0,45
bFGF mit Membraneinsätzen	0,34	0,09	0,07	0,28	0,19±0,13
bFGF/VEGF mit Membraneinsätzen	0,43	0,16	0,04	0,37	0,25±0,18
WT-Mix mit Membraneinsätzen	0,58	0,07	0,02	0,55	0,30±0,30

Tab. 30 Western Blot Ergebnisse für die indirekte Co-Kultur mit H₂O₂ verletzten Tubuluszellen: CK18 (densitometrische Analyse)

	CK18/Aktin				Mittelwert ± SD
Inserts H2O2 + EGF	0,09	0,21	0,54	2,56	0,85±1,16
Inserts H2O2	0,05	0,13	0,41	3,06	0,91±1,44
MSC		0,70	0,54	0,78	0,67±0,12
Inserts + EGF		0,26	0,73	2,77	1,25±1,33
Inserts		0,23	0,39	1,71	0,77±0,82
	ZO1/Aktin				
Inserts H2O2 + EGF	0,91	0,31			0,60±0,44
Inserts H2O2	0,88	0,69			0,76±0,18
MSC	0,92	1,12			1,02±0,10
Inserts + EGF	0,81	1,66			0,98±0,09
Inserts	1,09	1,02			1,16±0,49

Tab. 31 Direkte Co-Kultur von ASC und TEC: 4d (n=4)

	Mittelwert ± SD CD90	Mittelwert ± SD CK18
DF Co	55,75±1,99	13,80±26,52
ATRA Co	57,09±1,37	14,71±23,41
Mix Co	36,63±1,44	27,83±12,29

Tab. 32 Direkte Co-Kultur von ASC und TEC: 4d (n=4) im Vergleich zur Standardkultur

	Mittelwert \pm SD CD90	Mittelwert \pm SD CK18
DF	0,70 \pm 0,47	1,72 \pm 1,85
DF MSC	65,13 \pm 20,70	0,74 \pm 0,63
ATRA MSC	62,43 \pm 16,17	0,79 \pm 0,92
Mix MSC	69,31 \pm 22,53	0,69 \pm 0,82
DF Co	26,85 \pm 19,69	2,60 \pm 1,31
ATRA Co	17,56 \pm 10,58	1,60 \pm 1,07
Mix Co	24,44 \pm 12,30	2,30 \pm 1,22

Tab. 33 Direkte Co-Kultur von ASC und TEC: 7d (n=3)

	Mittelwert \pm SD CD90	Mittelwert \pm SD CK18
Kontrolle TEC	15,18 \pm 6,01	30,26 \pm 14,29
DF	92,09 \pm 4,85	1,23 \pm 0,83
ATRA	87,17 \pm 13,60	3,44 \pm 2,55
Mix	77,92 \pm 22,33	3,17 \pm 1,82
DF Co-Kultur	19,15 \pm 8,17	6,67 \pm 6,56
ATRA Co-Kultur	14,83 \pm 5,70	4,34 \pm 3,72
Mix Co-Kultur	13,34 \pm 5,25	2,77 \pm 2,96

Tab. 34 Markerexpression gewaschene ASC

	Passage 2				Mittelwert P2 ± SD	Passage 6							Mittelwert P6 ± SD
CD29	13,34	30,08	13,06	74,05	32,63±28,74	42,71	23,75	15,43	33,1	20,69	29,24	27,49±9,71	
CD44	89,54	94,65	69,42	88,93	85,64±11,11	82,64	67,23	88,82	88,89	72,29	92,88	82,13±10,25	
CD49a	1,26	4,18	0,69	0	1,53±1,84	0	0,66	1,22	3,76	1,04	7,56	2,37±2,85	
CD73	1,72	6,31	0	28,06	9,02±12,97	5,53	2,29	17,58	49,9	17,51	54,97	24,63±22,46	
CD90	54,27	81,2	73,56	53,37	65,60±13,96	17,22	51,23	59,8	90,06	55,57	81,8	59,28±25,70	
CD105	27,11	44,53	7,37	80,2	39,80±30,92	40,05	28,52	28,38	62,97	27,24	44,54	38,62±13,90	
CD166	28,25	48,16	9,77	72,53	39,68±26,93	39,92	42,41	33,98	73,35	40,78	53,15	47,27±14,22	
CD31	0	0,29	0	0	0,07±0,15	0	0	0,27	0	0		0,05±0,12	
CD34	0	0,82	0,88	0	0,43±0,49	3,95	0	11,49	0	1,63		3,41±4,80	
CD146	5,99	4,49	4,95	6,3	5,43±0,85	2,94	0,54	21,38	5,15	0,6		6,12±8,74	
smA	7,22	6,52	4,23	0	4,49±3,26	0	0	0,94	0	8,56		1,90±3,75	
Desmin	0,07	3,84	1,05	0	1,24±1,80	0	0	0,32	0,94	0		0,25±0,41	

Tab. 35 Markerexpression Standard isolierte ASC

	Passage 2				Mittelwert P2 ± SD	Passage 6						Mittelwert P6 ± SD
CD29	19,94	45,43	8,26	60,25	33,47±23,66	44,35	23,35	27,68	37,34	13,19	10,51	26,07±13,26
CD44	69,8	93,19	40,59	90,23	73,45±24,25	73,77	64,11	91,19	95,08	88,16		82,46±13,04
CD49a	4,73	3,06	7,83	3,02	4,66±2,26	0	0,33	0	5,7	0,19	2,92	1,52±2,33
CD73	5,75	0,85	7,54	21,22	8,84±8,72	2,65	1,38	22,47	47,75	9,48	27,11	18,47±17,73
CD90	48,42	95,92	80,99	57,72	70,76±21,65	4,15	29,67	66,9	69,21	46,39	67,1	47,24±26,19
CD105	25,42	71,28	4,71	68,06	42,37±32,67	48,66	22,56	9,97	68,34	59,93	4,57	35,67±26,92
CD166	23,15	57,96	4,78	67,59	38,37±29,43	28,13	31,87	30,03	65,99	34,36	19	34,90±16,11
CD31	0,4	0,5	0,04	0,01	0,24±0,25	0	0	0	0	0,31		0,06±0,14
CD34	1,44	4,73	0,39	7,14	3,43±3,09	4,26	0,44	26,23	3,89	0,83		7,13±10,82
CD146	0,35	4,03		6,8	3,73±3,24	0	1,45			0,88		0,78±0,73
smA	4,67	19,73	6,49	5,18	9,02±7,18	4,26	0,08	0	0,39	10,28		3,00±4,44
Desmin	0	11,06	0,8	0	2,97±5,41	0	0	0	0	0		0,00±0,00

Tab. 36 qPCR gewaschener ACS (Nestin, oct4, sall1, six2, smA, Desmin)

						Mittelwert ± SD
Nestin	3,49		1,24	1,36	3,63	2,43±1,31
Oct4	2,21		1,49	1,09	2,75	1,78±0,68
Sall1	1,30		1,52	1,29	2,93	1,76±0,79
Six2	0,45		0,35	0,92	0,76	0,64±0,23
smA	0,45		0,81	0,46	0,27	0,51±0,27
Desmin	0,40		0,29	0,66	0,60	0,52±0,20

Tab. 37 Expression von Oberflächenmarkern bei immunomagnetisch isolierten Zellen (Durchflusszytometrie)

	Mittelwert Kontrolle CD90 ± SD (n=3)	Mittelwert CD90+ ± SD (n=3)	Mittelwert CD90- ± SD (n=2)	Mittelwert Kontrolle CD49a ± SD (n=2)	Mittelwert CD49a+ ± SD (n=2)	Mittelwert CD49a- ± SD (n=2)
CD29	27,33±5,18	19,76±8,61	30,77±8,70	27,44±7,32	22,82±8,04	28,51±16,85
CD44	88,49±3,25	94,17±4,13	80,89±7,80	87,31±3,56	86,55±1,27	83,54±6,09
CD49a	1,37±1,47	2,42±1,40	3,95±6,59			
CD73	3,37±3,13	11,76±14,15	11,34±10,33	1,90±2,57	2,96±2,23	5,10±7,21
CD90				42,58±45,14	59,23±8,17	34,15±45,00
CD105	20,99±10,53	5,38±4,78	8,63±13,21	26,86±3,86	20,80±16,06	21,37±9,45
CD166	2,27±0,94	2,01±2,61	-0,06±0,20	1,97±1,10	6,95±3,97	14,01±19,57
	Mittelwert Kontrolle CD105 ± SD (n=3)	Mittelwert CD105- ± SD (n=3)	Mittelwert CD105+ ± SD (n=3)	Mittelwert Kontrolle CD271 ± SD (n=2)	Mittelwert CD271+ ± SD (n=2)	Mittelwert CD271- ± SD (n=2)
CD29	32,87±6,04	31,40±4,06	14,64±12,01	27,44±7,32	23,22±5,85	28,68±23,91
CD44	88,22±3,04	91,09±5,32	89,42±7,71	87,31±3,56	95,89±3,86	67,43±27,55
CD49a	1,42±1,35	1,03±1,28	0,49±0,65	1,52±2,05	-0,05±0,04	2,13±3,15
CD73	10,80±12,26	5,54±5,86	8,96±14,09	1,90±2,57	0,41±0,76	3,60±4,49

CD90	63,08±28,70	61,83±31,52	40,72±39,77	42,58±45,14	21,98±23,50	41,00±33,84
CD105				26,86±3,86	67,50±12,46	23,48±14,25
CD166	6,12±3,81	10,24±8,36	13,95±20,77	1,97±1,10	9,37±3,54	1,83±0,07

Tab. 38 qPCR immunomagnetisch isolierter Zellen (Nestin, oct4, sall1, six2, smA, Desmin)

	Mittelwert CD90+ ± SD (n=3)	Mittelwert CD90- ± SD (n=2)	Mittelwerte CD105+ ± SD	Mittelwerte CD105- ± SD (n=3)	Mittelwert CD271+ ± SD (n=2)	Mittelwert CD271- ± SD (n=2)	Mittelwert CD49a+ ± SD (n=3)	Mittelwert CD49a- ± SD (n=3)
Nestin	1,52±1,00	6,19±7,93	1,03±0,82	0,87±1,02	0,96±0,70	1,30±1,17	4,45±5,43	1,39±0,63
oct4	1,63±1,53	0,84±0,51	3,60±4,18	2,09±2,96	1,16±0,64	3,30±4,56	1,35±1,00	0,99±0,78
sall1	4,71±6,03	0,62±0,13	2,01±0,68	1,19±1,32	1,22±0,78	2,42±3,42	1,86±2,05	1,32±1,29
six2	3,07±3,80	3,78±4,64	3,80±2,87	1,65±0,74	1,94±1,29	6,24±0,85	2,80±2,62	4,26±4,45
smA	1,13±0,17	2,81±2,55	0,83±0,36	1,68±0,99	5,31±5,67	2,23±1,23	1,51±0,97	1,19±0,89
Desmin	0,84±0,20	11,37±15,05	2,71±0,90	0,83±0,28	1,66±1,36	1,23±1,52	6,82±10,37	1,28±1,03

Tab. 39 Oil-Red-O-Färbung nach adipogener Induzierung der immuomagnetisch aufgereinigten ASC

							Mittelwert ± SD
Kontrolle (Standard isolierte Zellen)	28,76	37,10	38,58	48,35	52,94	27,30	38,84±10,27
CD49a+			41,29	45,56			43,42±3,02
CD49a-			22,63	48,45		41,94	37,67±13,43
CD90+			21,84	49,32			35,58±19,43
CD90-			21,49	42,94			32,21±15,17
CD105+	23,61		40,83				32,22±12,18
CD105-	23,48	33,51	28,37				28,46±5,01
CD271+			46,64	52,28			49,46±3,99
CD271-			28,72	50,49			39,60±15,39

Publikationen

Human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness.

Baer PC, Griesche N, Luttmann W, Schubert R, Luttmann A, Geiger H. *Cytotherapy*. 2009 Nov 24. [Epub ahead of print]

A Simple Modification of the Separation Method Reduces Heterogeneity of Adipose-Derived Stem Cells.

Nadine Griesche, Werner Luttmann, Arlette Luttmann, Thekla Stammermann, Helmut Geiger, Patrick C. Baer. Bei *Cells Tissues Organs* angenommen zur Publikation

Danksagung

Zum Schluss möchte ich allen Personen danken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Bereiter-Hahn und Herrn Prof. Geiger bedanke ich mich für die Vergabe des Themas, sowie die Unterstützung während der gesamten Zeit. Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich auch an Prof. Bereiter-Hahn richten, der stets Zeit für Besprechungen hatte und mich immer thematisch und praktisch unterstützt hat. Herrn Prof. Geiger möchte ich insbesondere für die Bereitstellung der Mittel und des Laborplatzes danken, ohne die meine Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Vor allem bedanke ich mich für die engagierte Betreuung bei Patrick Baer, der mich mit viel Geduld und Verständnis bei meiner Arbeit unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für thematische Probleme und Diskussionen hatte.

Des Weiteren danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders möchte ich Michaela Plößer für ihre vielen Hinweise und Hilfen bei der Arbeit im Labor danken.

Natürlich gilt mein Dank auch allen anderen, die mich während meiner Arbeit tatkräftig unterstützt haben. Ich möchte mich noch einmal bei all denjenigen bedanken, die diese Arbeit unter viel Zeitaufwand Korrektur gelesen und mich auf die Schwächen hingewiesen haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Familie danken, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung das Studium und diese Arbeit ermöglichten und sie mit Anteilnahme verfolgt haben.

Lebenslauf

Name: Nadine Griesche

Titel: Dipl. Ing.

Geburtsdatum und –ort: 19.06.1980 in Berlin

11/2006- 1/2010	Universitätsklinikum Frankfurt, Zentrum der Inneren Medizin, Nephrologie Doktorand Differenzierung von Stammzellen aus Fettgewebe in epitheliale Zellen
2004- 2006	Robert-Koch-Institut, Adenoviren Diplomarbeit Untersuchungen zur Replikation humaner Adenoviren auf porcinen Zelllinien
2004	Virchow Klinikum, Charité, Berlin Studienarbeit Ex-vivo Expansion CMV-spezifischer T-Zellen
6/2004-10/2006	Virchow Klinikum, Charite, Berlin studentische Hilfskraft in der Sprechstunde für Lippen-Kiefer und Gaumenspalten

3. Schule und Ausbildung

10/2001-06/2006	Studium med. Biotechnologie (Technische Universität Berlin), Abschluss Diplom Ingenieur Biotechnologie, 1,7
04/2002	Vordiplom in Biotechnologie
10/1999 – 9/2001	Studium Lebensmitteltechnologie (Technische Universität Berlin)
06/1999	Abitur, Schiller Oberschule Berlin
1986-1992	Hansa-Grundschule-Berlin